

MESOHUOKOISTEN PIINANOPARTIKKELEIDEN KÄYTTÖ LÄÄKEAINEEN  
KULJETTIMENA KEHITETTÄESSÄ HOITOMUOTOJA VISKERAALISEEN  
LEISHMANIAASIIN

Salla Mäkelä

Pro-gradu tutkielma

Biotieteiden koulutusohjelma (biokemia)

Itä-Suomen yliopiston luonnontieteellis-metsätieteellinen tiedekunta

Syyskuu 2015

Itä-Suomen yliopisto, luonnontieteellis-metsätieteellinen tiedekunta

biotieteiden koulutusohjelma (biokemia)

Salla Mäkelä: Mesohuokoisten piinanopartikkeleiden käyttö lääkeaineen kuljettimena kehitettäessä hoitomuotoja viskeraaliseen leishmaniaasiin

Pro gradu-tutkielma 38 sivua

Pro gradu-tutkielman ohjaajat: Jussi Rytönen, Sinikka Parkkinen ja Ale Närvänen

Syyskuu 2015

Avainsanat: Viskeraalinen leishmaniaasi, mesohuokoinen piinanopartikkeli, buparvaquone, hoitomuodot

Tiivistelmä

Pro gradu-tutkielma ”Mesohuokoisten piinanopartikkeleiden käyttö lääkeaineen kuljettimena kehitettäessä hoitomuotoja viskeraaliseen leishmaniaasiin” käsittelee mahdollisen uuden hoitomuodon kehittämistä viskeraaliseen leishmaniaasiin. Viskeraalinen leishmaniaasi on malarian jälkeen maailmanlaajuisesti eniten tappava loisperäinen sairaus. Taudin hoitona käytettävät lääkeaineet ovat erittäin toksisia ja rokotetta sairauteen ei ole. Buparvaquone on uusi lääkeaine, jonka on havaittu vaikuttavan leishmaniaasin aiheuttaviin loisiin estävästi. Kyseinen lääkeaine on erittäin huonosti liukeneva, joten sen saamiseksi soluun se sidottiin mesohuukoisiin piinanopartikkeleihin, joilla voitaisiin helpottaa lääkeaineen internalisaatiota ja kohdentamista soluun.

Mesohuokoisten piinanopartikkeleiden internalisaatiota ja kohdentamista tutkittiin hiirestä eristetyn RAW 264.7-makrofagilinjan avulla. Internalisaatiota seurattiin mikroskopoinnilla eri aikapisteissä fluoresenssin avulla. Myös nanopartikkeleiden toksisuus soluille tutkittiin. Lisäksi yhteistyölaboratoriomme Intiassa testasi nanopartikkeleita loisen infektoimiin soluihin.

Tuloksissa havaittiin pintaproteiinien ja inkubointiajan vaikuttavan internalisaation määrään. Avidiini-konjugoidut partikkelit internalisoituivat neljässä tunnissa parhaiten. Partikkelit eivät ole toksisia terveille soluille. Buparvaquone tappoi solun sisältä loiset, mutta solut selvisivät elävinä.

# Sisällysluettelo

## 1. Johdanto

## 2. Kirjallisuuskatsaus

### 2.1. Viskeraalinen leishmaniaasi tautina

#### 2.1.1. Taudinkuva

#### 2.1.2. Infektion mekanismit solussa

#### 2.1.3. Diagnoosi

#### 2.1.4. Taudin hoitomuodot

### 2.2. Mesohuokoiset piinanopartikkelit

#### 2.2.1. Rakenne

#### 2.2.2. Lääketieteellinen käyttö

### 2.3. Buparvaquone

## 3. Tutkimuksen tarkoitus

## 4. Materiaalit ja menetelmät

### 4.1. Solujen ylläpito

### 4.2. Käytetyt nanopartikkelit

### 4.3. Internalisaatiokokeet

### 4.4. Nanopartikkeleiden toksisuusmittaukset

### 4.5. Nanopartikkeleiden testaus *L. donovani* -amastigootteihin

## 5. Tulokset

### 5.1. Internalisaatiokokeet

### 5.2. Nanopartikkeleiden toksisuusmittaukset

### 5.3. Nanopartikkeleiden testaus *L. donovani* -amastigootteihin

## 5. Pohdinta

## 6. Lähdeluettelo

## 1. Johdanto

Leishmaniaasi on loistauti jonka aiheuttaa Leishmania- sukuun kuuluvat alkueläimet. Tauti leviää naaraspuolisen hietakärpäsen (*Phelobotomine*) pureman välityksellä. Leishmaniaasia esiintyy trooppisilla ja subtrooppisilla alueilla; Etelä-Amerikassa, Itä-Afrikassa ja Aasiassa. Taudista esiintyy neljää eri muotoa, joista viskeraalinen leishmaniaasi (tunnetaan myös nimellä kala-azar) on vaarallisin. Leishmaniaasin yleisin muoto on iholla esiintyvä muoto (engl. cutaneous leishmania); muita muotoja ovat limakalvolla esiintyvä muoto (engl. mucocutaneous leishmania) ja viskeraalisen leishmaniaasin jälkeinen iholla esiintyvä muoto (engl. post-kala-azar dermal leishmaniasis). (Chappuis et. al. 2007). Tämä tutkielma keskittyy viskeraaliseen leishmaniaasiin ja siihen kehitettäviin hoitomuotoihin.

Tällä hetkellä taudin hoitomuotoina toimivat lääkeaineet ovat myrkyllisiä ja loiset kehittävät erittäin herkästi resistenssiä lääkeaineita vastaan. Lääkkeiden yhdistelmäterapiat ovat eräs vaihtoehto, mutta loisten kehittämä resistenssi vaikeuttaa näiden yhdistelmien käyttöä. Lisäksi yhdistelmistä aiheutuvat sivuvaikutukset voivat olla erittäin haitallisia (esimerkiksi kuurous tai sisäelimille myrkyllisyys). Viskeraaliseen leishmaniaasiin ei ole olemassa rokotetta.

Nanoteknologiaa hyödynnetään koko ajan enemmän lääketieteessä ja sairauksien hoitomuotojen kehittämisessä. Mesohuukoiset piinanopartikkelit ovat osoittautuneet erittäin hyödyllisiksi sekä diagnosoinnissa että sairauksien hoitojen tukimuotona. Piitä pystyy muokkaamaan lähes rajattomasti ja siihen pystyy sitomaan paljon erilaisia molekyyliä, mikä tekee siitä erittäin monipuolisen.

Tämän pro-gradu tutkielman tarkoituksena on testata mesohuukoisten piinanopartikkeleiden internalisaatiota makrofageihin, joita leishmaniaasia aiheuttava loinen käyttää isäntäsoluinaan. Työssä käytetään erilaisia partikkeleita: erona on pinnalle konjugoitu proteiini. Tarkoituksena on testata, vaikuttaako konjugoitu proteiini internalisaation tehokkuuteen. Lisäksi optimoidaan partikkeleiden inkubointiaikaa ja olosuhteita sekä testataan ovatko partikkelit tai niihin sidottu lääkeaine toksinen. Lääkeaineena on buparvaquone. Buparvaquone on karjan loistautiin käytettävä lääkeaine, joka on osoittanut erittäin hyviä vaikutuksia myös leishmaniaasin aiheuttavaa loista vastaan.

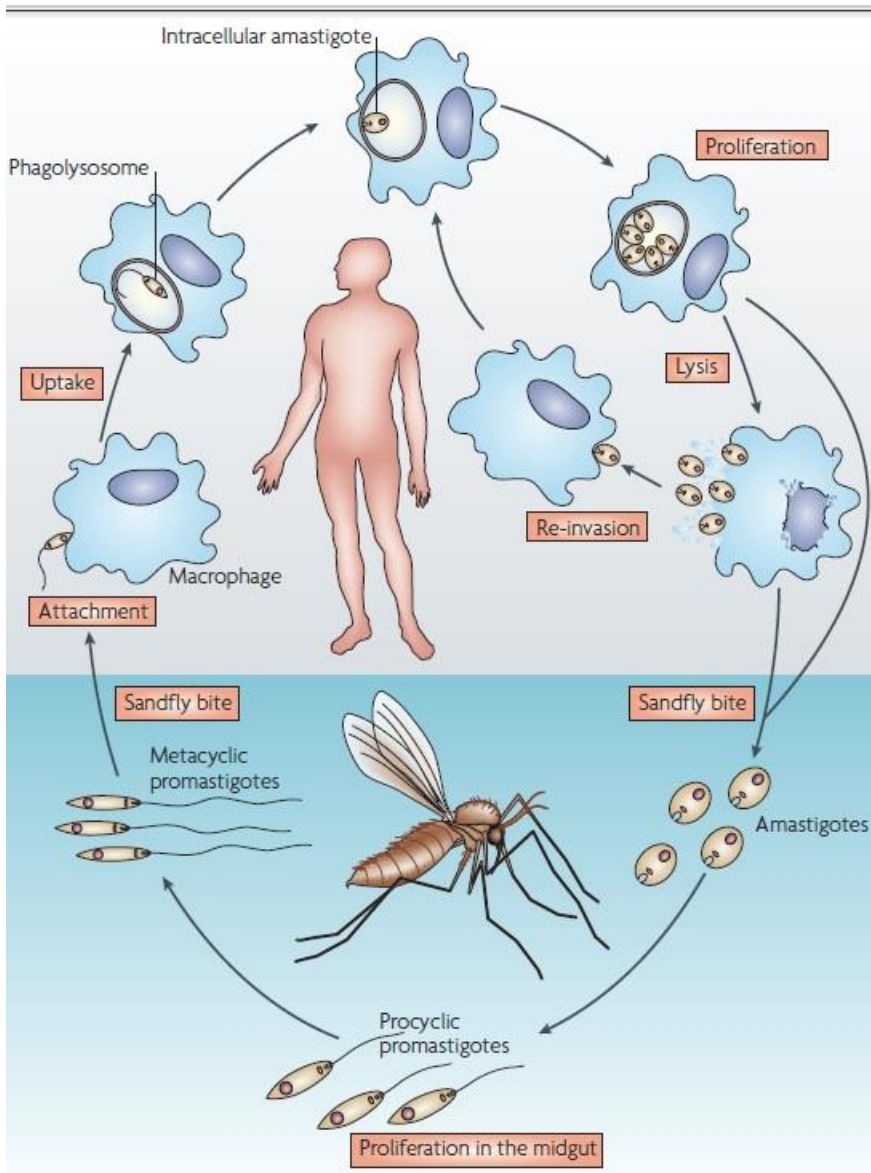
## 2. Kirjallisuuskatsaus

### 2.1. Viskeraalinen leishmaniaasi tautina

#### 2.1.1. Taudinkuva

Viskeraalinen leishmaniaasi (VL), toiselta nimeltään *kala-azar*, on leishmaniaasi-taudin vaarallisin muoto, joka hoitamattomana johtaa kuolemaan. Kyseistä muotoa aiheuttavat kaksi *Leishmania*-suvun lajia: *Leishmania Donovan*i ja *Leishmania Infantum*. Esiintyvyys lajeilla on hieman erilainen: *Leishmania Donovan*ia esiintyy Itä-Afrikassa ja Intian niemimaalla, *Leishmania Infantum*ia Etelä-Amerikassa, Euroopassa ja Pohjois-Afrikassa. (Chappuis et. al. 2007).

Loisella on hyvin tyypillinen elinkaari, joka on esitetty kuvassa 1. Se pääsee elimistöön naaraspuolisen hietakärpäsen pureman välityksellä ja pureman yhteydessä loinen on niin kutsutussa promastigootti-muodossa (engl. promastigote), jolloin sillä on liikkumista edistävä flagella infektoinnin helpottamiseksi. Loinen infektoi ja käyttää isäntäsolunaan makrofageja. Infektoidessaan solun loinen erilaistuu amastigootti-muotoon, jossa se kykenee lisääntymään. Tällöin flagella irtoaa ja loinen kykenee jakautumaan. Ne jakaantuvat, hajottavat isäntäsolun ja lähtevät leviämään muualle elimistöön veri- ja imusuoniston kautta infektoiden uusia monosyyttejä tai makrofageja. Uuden hietakärpäsen pureman seurauksena loinen pääsee leviämään uuteen hietakärpäseen ja edelleen ihmiseen. (Cappuis et. al. 2007). Erittäin vaarallisen taudista tekee sen leviäminen tärkeisiin sisäelimiin kuten maksaan, pernaan ja luuytimeen (Kumar & Nylén, 2012).



Kuva 1. *Leishmania donovani* -loisen tyypillinen elinkaari. (Chappuis et. al. 2007).

Taudin itämisaika on kahdesta kuukaudesta kuuteen kuukauteen (Chappuis et. al. 2007). Taudin oireisiin kuuluvat kuume, suurentunut perna ja maksa. Levitessään se voi aiheuttaa myös haavaumia ja ripulia sekä painon laskua. Hoitamattomana viskeraalinen leishmaniaasi aiheuttaa limakalvojen verenvuotoa, verenmyrkytyksen ja yleisen immunitetin laskemisen. Lopulta tauti johtaa kuolemaan, mikäli sitä ei hoideta ajoissa. (Kumar & Nylén, 2012).

Viskeraalisen leishmaniaasin jälkitautina saattaa ilmentyä post-kala-azar leishmaniaasia (PKDL). Tämä muoto saattaa itää jopa kuukausia viskeraalisen leishmaniaasin jälkeen. PKDL ilmenee infektoituneiden makrofagien kerääntymisenä iholle. Viskeraalinen leishmaniaasi altistaa infektoituneen henkilön helpommin myös HI-virukselle ja päinvastoin: HIV-potilas on huomattavasti alttiimpi leishmaniaasille. (Stanley & Engwerda, 2007).

Loisen aiheuttama infektio vaikuttaa erittäin paljon immuunijärjestelmän toimintaan. Kuten edellä on mainittu, pidemmälle kehittynyt infektio aiheuttaa immuunijärjestelmän romahtamisen. Pernassa loisen infektio aiheuttaa interleukiini 10:n (IL-10) ja TNF $\alpha$ :n (engl. tumor necrosis factor) tasojen nousun. TNF $\alpha$  tuhoaa infektoitunutta kudosta ja aktivoi samalla IL-10 toimintaa. IL-10 puolestaan hillitsee ja säätelee infektoituneen kudoksen tuhoamista. Tämän interleukiinin tasot nousevat korkeiksi amastigoottien aiheuttaman infektion aikana. IL-10 vähentää makrofagien aktiivisuutta infektiotilassa, jolloin ne eivät signaloi dendriittisolujen kanssa. Tämän signaloinnin pysähtyminen estää dendriittisolujen liikkumisen eli migraation T-solujen aktivointialueille alentaen siten T-solujen aktiivisuutta tai jopa tappaen niitä infektiotilanteessa. Tällöin immuunijärjestelmän signaointi ei toimi kunnolla ja loinen välttää immuunijärjestelmän tuhoamaksi joutumisen. Lisäksi makrofagit ovat toimimattomampia, mikä turvaa loisen kasvamisen solun sisällä. (Kumar & Nylén, 2012).

### 2.1.2. Infektion mekanismit solussa

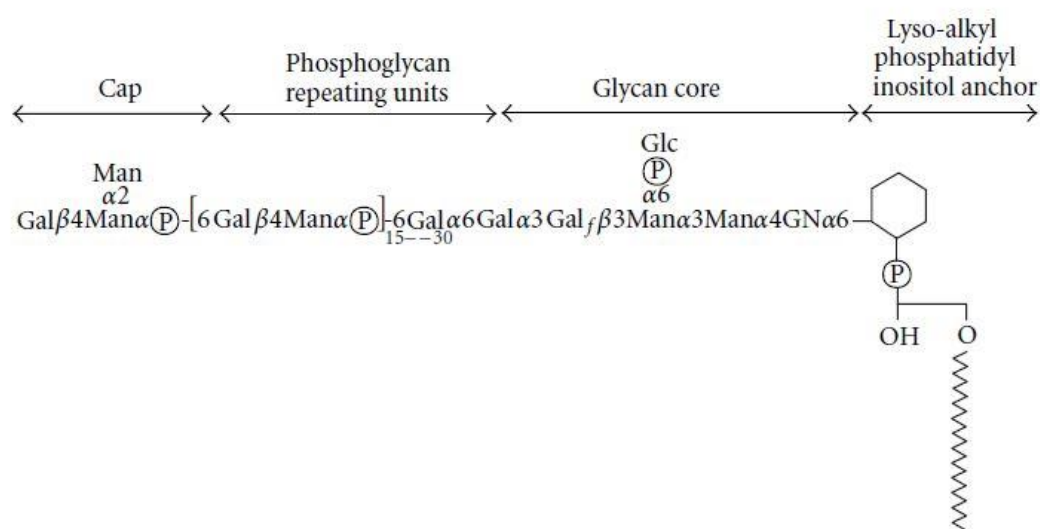
Viskeraalinen leishmaniaasi käyttää primaarisena isäntäsolunaan makrofageja. Infektion alussa promastigootti-muotoinen loinen internalisoituu makrofagiin fagocytoosilla ja erilaistuu amastigootti-muotoon. Tätä varten molempien muotojen on täytynyt kehittää tehokkaat puolustusmekanismit välttääkseen immuunipuolustuksen toiminnan. Tyypillisesti internalisaatiossa muodostuu fagosomi, johon varhainen lysosomi fuusioituu ja tällöin mahdollinen fagosomin sisältö tuhotaan. Amastigootti-muoto pystyy estämään fuusion erittämällä fagosomin pintaan F-aktiinia, joka estää signaalien kulun. Tällöin amastigootit välttävät varhaisten lysosomien liittämisen fagosomiin. (Modarin & Descoteaux, 2012).

Internalisaation ja erilaistumisen jälkeen amastigootit muodostavat vakuolin, joka häiritsee solun toimintaa. (Modarin & Descoteaux, 2012). Makrofagien sisällä kehittyä happiradikaaleja, jotka tuhoavat vieraita partikkeleita. Normaalisti näitä radikaaleja alkaa kehittyä välittömästi kun vieras



partikkeli pääsee makrofagin sisälle. Amastigootit pystyvät estämään näiden radikaalien valmistamisen inaktivoimalla mekanismin, jolla kootaan radikaalien syntyyn tarvittava kompleksirakenne (NADPH-oksidaasi). Tämän mekanismin häiritsemisen havaitsivat Lodge ja Descoteaux hiirillä vuonna 2006.

Promastigootit muodostavat infektion yhteydessä pinnalleen lipofosfoglykaaneja (LPG). Nämä lipofosfoglykaanit ovat rakenteeltaan ominaisia vain leishmania-loiselle ja niiden rakenne on esitetty kuvassa 2. Näiden lipofosfoglykaanien muodostuminen pinnalle tapahtuu tietyssä kehitysvaiheessa ennen loisen pääsyä makrofagiin. Kun promastigootti kehittyy amastigootiksi, lipofosfoglykaanien tuotto loppuu.. Lipofosfoglykaanit peittävät promastigoottien pinnan kokonaan. LPG on vahvasti mukana sekä loisten internalisaatiovaiheessa että makrofagin sisäisen toiminnan muokkauksessa. Internalisaatiovaiheessa LPG sitoutuu joko suorasti tai epäsuorasti makrofagin pinnalla oleviin reseptoreihin, jolloin internalisaatio helpottuu. (Franco et. al. 2012). Internalisaation jälkeen loisen pinnalla oleva LPG sitoutuu varhaisen lysosomin pintaan muokaten sen kalvorakenteita. Kalvorakenteiden muutokset häiritsevät signaalireittien toimintaa, jolloin fagosomin fuusio varhaiseen lysosomiin estyy. Tämän fuusion toimimattomuus estää toiminnallisten lysosomien muodostumisen, jolloin fagosomin sisältöä ei saada tuhottua ja promastigootit pääsevät kehittymään amastigootteiksi. (Moradin & Descoteaux, 2012). Näiden kaikkien mekanismien toiminnan tunteminen on äärimmäisen tärkeää kehitettäessä diagnosointi- ja hoitomuotoja leishmaniaasiin. Esimerkiksi amastigoottien kehittämät lipofosfoglykaanit ovat uniikkeja vain tällä loistaudille. Kuitenkin monia mekanismeja on vielä selvittämättä.



Kuva 2. Lipofosfoglykaanin rakenne (Man=mannoosi, Gal=galaktoosi, GN=glukosamiini, GLC=glukoosi). (Franco et. al. 2012).

### 2.1.3. Diagnoosi

Viskeraalinen leishmaniaasi voidaan diagnosoida monella tavalla ja uusia diagnosointimenetelmiä kehitetään koko ajan. Diagnoosissa on kuitenkin useita ongelmia, joista yhtenä suurimpana ongelmana on taudin esiintymisalue. Endeemisillä alueilla esiintyy paljon muitakin loistauteja, useimmin malaria. Tautien yhteisesiintyvyys vaikeuttaa oikean diagnoosin tekemistä, sillä monilla loistaudeilla on samantyyppisiä oireita ja endeemisillä alueilla diagnosointien tekeminen on kallista ja hidasta. Alueilla on paljon myös HI-virusta, joka vaikeuttaa diagnoosia. (Reithinger & Dujardin, 2006). Erilaisia menetelmiä kehitetään koko ajan. Haasteena on löytää vaihtoehto, jolla saadaan diagnoosi tehtyä varmasti. Monet tällä hetkellä käytössä olevat metodit eivät ole riittävän varmoja oikeaan diagnoosiin. (Abass et. al. 2015). Oikea diagnoosi on erittäin tärkeätä tässä taudissa, sillä hoitomuotona käytettävät lääkeaineet ovat toksisia, jolloin väärin positiivisten diagnoosien teko voi olla jopa vaarallista (Chappuis et. al. 2007).

Varmin tapa diagnosoida VL perustuu kudospäätteisiin. Tämä on erittäin invasiivinen menetelmä, sillä taudin edetessä sisäelimiin, kudospäätteet tulee saada paikasta joissa VL ilmenee (esimerkiksi luuytimeistä tai maksasta). Näytteet analysoidaan mikroskopian avulla. Näytteistä tarkastellaan mahdollisten loisten määrää ja verrataan näytekudosta terveeseen kudokseen. Kudospäätteiden perusteella tehtävän diagnoosin ongelmana ovat virheelliset tulokset. Näytteessä ei välttämättä ole riittävästi loisia, jotta diagnoosi pystyttäisiin varmasti antamaan. Lisäksi kudospäätteiden ottaminen ja analysointi mikroskopian avulla on teknisesti haastavaa ja aikaa vievää, joten se ei ole helpoin tapa saada diagnoosi. (Reithinger & Dujardin, 2006).

Serologiset eli seerumista tehtävät immunologiset testit ovat paljon tutkittu diagnosointimenetelmä. VL on pitkäaikainen sairaus jolloin se nostaa etenkin veressä kiertävien vasta-aineiden määrää suureksi. Suuri vasta-ainekirjo hankaloittaa seerumista tehtäviä testejä taustavaikutuksen vuoksi. (Cruz et. al. 2006). Testit perustuvat *L. donovanin* rekombinanttiproteiineihin rKE16 ja rKLO8. Alkuperäiset proteiinit ovat kinesini-liitettynä proteiineja. Loisen kannasta riippuu, kumpaa proteiinia kannattaa käyttää määrittämisessä. Sudanin alueella olevat kannat ilmentävät KLO8-proteiinia enemmän, kun taas Intian niemimaalla olevat kannat ilmentävät enemmän KE16-proteiinia. Rekombinanttiproteiinien avulla etsitään mahdollisia taudinaiheuttajan vasta-aineita seerumista. Vasta-aineiden etsintä voidaan suorittaa esimerkiksi ELISAn (engl. enzyme-linked immunosorbent assay) tai suoran agglutinaatiotestin (engl. direct agglutination test, DAT) avulla. Metodien tarkkuus saattaa vaihdella endeemisten alueiden välillä, sillä taudin aiheuttavaa loista

esiintyy useampaa kantaa, jolloin vasta-ainekirjo on hieman erilainen. Myös mahdolliset muut infektiot vaikuttavat vasta-aineiden määrään ja tyyppiin. Esimerkiksi malaria vaikeuttaa serologisten testien tekoa nostamalla vasta-aineiden määrä osaltaan. (Abass et. al. 2015).

PCR on yleisin molekulaarinen diagnosointimenetelmä. Sitä voidaan käyttää taudin diagnosointiin monella tavalla. PCR:n avulla pystytään saamaan tarkkoja diagnooseja riippumatta taudinaiheuttajan kannasta. Tällä menetelmällä voidaan myös määrittää laji ja loisen elävyysprosentti. Lisäksi sitä voidaan mahdollisesti käyttää lääkeresistenssin määrittämiseen. Tämä metodi vaatii tarkkaa työtä ja ongelmana on usein standardien puuttuminen, jolloin testituloksien vertaaminen on lähes mahdotonta. (Reithinger & Dujardin, 2006).

Kuten yllä on mainittu, varman diagnoosin saaminen on haasteellista. Usein tarvitaan monia menetelmiä, jotta voidaan saada varmuus taudista ja sen aiheuttajasta. Tämä on tärkeitä kehitettäessä uusia hoitomuotoja, sillä taudin parantuminen pitää myös pystyä todentamaan samaisilla metodeilla.

#### 2.1.4. Taudin hoitomuodot

Viskeraaliseen leishmaniaasiin on olemassa useita erilaisia hoitomuotoja. Hoitomuodoissa käytetään yhtä lääkeainetta tai muutaman lääkeaineen yhdistelmää. Yhdistelmähoidot ovat vielä tutkimusvaiheessa. Hoitona käytettävien lääkeaineiden ongelmana on toksisuus. Kaikki kaupallisessa käytössä olevat lääkeaineet ovat toksisia, joten uusille lääkeaineille on tarvetta. Tällä hetkellä tautiin ei ole olemassa rokotetta. (Chappuis et. al. 2007).

Pentavalentit antimonit ovat tunnetuin lääkeaineryhmä, jota käytetään viskeraalisen leishmaniaasin hoitoon. Tämä lääkeryhmä on ollut hoitomuotona käytössä kaikkein pisimpään: ensimmäiset raportit viskeraalisen leishmaniaasin hoidosta antimoneilla ulottuvat vuoteen 1915. Pentavalentit antimonit pääsevät soluun sisälle sokerirakenteita tunnistavien proteiinien avulla. Antimonit reagoivat sekä promastigootteihin että amastigootteihin. Soluun päästessään pentavalentit antimonit pelkistyvät trivalenteiksi antimoneiksi, jotka tuhoavat loisia. (Haldar et. al. 2011). Antimonit estävät rasvojen hapettumisen ja häiritsevät glykolyysiä ja energia-aineenvaihduntaa. Tarkkoja mekanismeja ei kuitenkaan tiedetä. (Kaur & Rajput, 2014).

Pentavalenttien antimonien käytössä on useita ongelmia. Se injektoidaan joko lihakseen tai suoraan suoneen. Antimonit aiheuttavat erittäin paljon sivuvaikutuksia; esimerkiksi pahoinvointia, pistoskipua, rytmihäiriöitä ja hepatiittia. Hoitojakso on pitkä: 21-28 vuorokautta. (Montzote 2009). Suurimpana ongelmana antimonien käytössä on kuitenkin resistenssin kehittyminen. Etenkin promastigootit pystyvät estämään pentavalenttien antimonien pelkistymisen trivalenteiksi antimoneiksi. Tällöin antimonien toimintamekanismi estyy. (Haldar et. al. 2011).

Pentamidiinit ovat toinen lääkeaineryhmä, joka on ollut pitkään käytössä. Pentamidiinit vaikuttavat loisen transkriptiokoneistoon. Ne kerääntyvät mitokondrioihin ja estävät sitä kautta signaalireittien toiminnan, jolloin transkriptio estyy. (Singh & Sundar, 2014). Pentamidiinit voidaan antaa potilaalle injektiona lihakseen tai suoneen. Ne aiheuttavat pahoinvointia, päänsärkyä ja joskus jopa metallin makua suussa. Lisäksi tällä hoitomuodolla on erittäin alhainen paranemisprosentti suhteessa muihin lääkeaineisiin. (Montzote 2009). Toisena ongelmana tämänkin lääkeaineen tapauksessa on resistenssin kehittyminen. Resistentit solut päästävät lääkeainetta helpommin ulos mitokondrioista, eikä sitä pääse helposti sisälle. (Kaur & Rajput, 2014).

Miltefosiini on vuonna 2002 hyväksytty lääkeaine viskeraalisen leishmaniaasin hoitoon. Alun perin se on kehitetty rintasyöpää varten, mutta se on myrkyllinen suolistossa joten sen käyttö siinä tarkoituksessa lopetettiin. Se oli jo hyväksytty ihmiskäyttöön, joten se oli helppo saada markkinoille myös tämän taudin hoitomuotona. Miltefosiini on alkyyli fosfolipidi, joka voidaan antaa suun kautta. Tämä helpottaa huomattavasti kotihoitoa potilaille. (Sundar & Olliaro, 2007) Miltefosiinilla on melko korkea paranemisprosentti ja sen vaikutukset ovat samanlaisia niin lapsilla kuin aikuisillakin. (Pèrez-Victoria et. al. 2009).

Miltefosiinin toimintamekanismi perustuu apoptoosin laukaisemiseen. Ohjelmoitu solukuolema tappaa makrofagin ja samalla loisen sen sisältä. (Sundar & Olliaro, 2007). Miltefosiinilla on melko rajuja sivuvaikutuksia kuten oksentelua ja ripulia. Lisäksi se on teratogeeninen eli aiheuttaa sikiön epämuodostumia. (Pèrez-Victoria et. al. 2009). Sivuvaikutuksia esiintyy noin kolmella prosentilla hoidetuista potilaista. Myös lääkkeen kallis hinta estää lääkeaineen laajempaa käyttöä. Miltefosiinilla on pitkä puoliintumisaika (150–200 h), mikä tekee sen alttiiksi lääkeresistenssin kehittymiselle. Pitkä puoliintumisaika ja suun kautta annostelu aiheuttavat hyvin helposti lääkeresistenssiä loisissa. (Sundar & Olliaro, 2007). Toisaalta pitkän puoliintumisaikansa vuoksi miltefosiini olisi hyvä mahdollinen lääke suunniteltaessa erilaisia kombinaatioterapioita. (Pèrez-Victoria et. al. 2009).

Paromomysiini on antibiootti, jota käytetään viskeraalisen leishmaniaasin hoitoon. Paromomysiiniä käytetään myös tavallisena antibioottina ja viskeraalisen leishmaniaasin hoitomuodoksi se hyväksyttiin vuonna 2006. Paromomysiiniä voidaan käyttää suun kautta annettavana kapselina, ihovoiteena ja pistoksena lihakseen. Suun kautta otettavassa muodossa ongelmana on erittäin huono imeytyminen ja voiteet saattavat aiheuttaa esimerkiksi ihottumaa. Lihakseen injektoitava paromomysiini on tehokkain. Lisäksi se on yksi halvimmista hoitomuodoista ja sen sivuvaikutukset eivät ole niin suuria, kuin muiden lääkeaineiden kohdalla. (Wiwanitkit, 2012).

Paromomysiinin toimintamekanismi perustuu translaation häiritsemiseen. Se sitoutuu ribosomien osiin estäen niiden toiminnan. Lisäksi se häiritsee aineenvaihduntaa sitoutumalla loisen pinnalla oleviin lipofosfoglykaaneihin. (Chawla et. al. 2011). Vaikka paromomysiinin teho suhteessa sen sivuvaikutuksiin onkin hyvä, sillä on vakava sivuvaikutus. Paromomysiini on otoksinen eli sisäkorvalle myrkyllinen etenkin suurina annoksina. Lisäksi sen tehokkuus vaihtelee paljon alueittain. Musa et. al. osoittivat vuonna 2010 että esimerkiksi Sudanissa hoito ei ole tarpeeksi tehokasta ilman suuria annostuksia. Suurilla annostuksilla ja pidemmällä hoitoajalla saatiin hyvä lopputulos, mutta ototoksisuutta esiintyi: yhdellä potilaista katosi kuulo kuudeksi kuukaudeksi. (Musa et. al. 2010). Paromomysiiniä käytetään antibioottina muihin tulehduksiin ja sitä suositellaan käytettäväksi infektion hoitoon ja mahdollisena kombinaatioterapiana. (Wiwanitkit, 2012).

Amfoterisiini B (AmB) on tällä hetkellä paljon tutkittu ja käytetty lääkeaine viskeraalisen leishmaniaasin hoitoon. AmB on luonnosta eristetty antibiootti ja sen toimintamekanismi perustuu rasvamolekyyleihin sitoutumiseen. Kuten edellä on mainittu, promastigootit kehittävät infektoidessaan muun muassa lipofosfoglykaaneja, joilla ne sekoittavat isäntäsolun solukalvon toimintaa. Tämä solukalvon ja signaalireittien sekoittaminen on avain niiden internalisaatioon. AmB:n toiminta estää loisen aiheuttaman solukalvon rasvahappojen muokkaamisen, jolloin internalisaatio estyy. AmB pystyy sitoutumaan sekä loisen pinnalla oleviin ergosteroliin että solukalvon pinnalla olevaan kolesteroliin. Tämä vuorovaikutus estää loisen toiminnan. (Paila et. al. 2010).

Loisen sijainti tärkeissä sisäelimeissä aiheuttaa ongelmia, sillä AmB on erittäin toksinen munuaisille. Injektio suoraan suoneen aiheuttaa lääkeaineen kulkeutumisen muuallekin kuin kohde-elimeen. (Mudavath et. al. 2014). Muita sivuvaikutuksia ovat esimerkiksi injektion jälkeinen kuume ja kaliumtasojen lasku veressä. Lääkeaineen kallis hinta ja hankala infuusio aiheuttavat myös omat ongelmansa. (Chappuis et. al. 2007). AmB:llä hoidettaessa paranemisprosentti on kuitenkin hyvä, joten paljon tutkitaan mahdollisia muita reittejä, joilla lääkeaine saataisiin kuljetettua vain

kohdesoluihin. Eräs vaihtoehto on sitoa lääkeaine grafeeniin, jonka avulla se saataisiin kuljetettua kohdesoluun. Grafeenit ovat helposti muokattavia hiililauttoja, joihin pystyy sitomaan lääkeaineita. Grafeenin ongelma on siitä syntyvän grafeenioksidin toksisuus. (Mudavath et. al. 2014). Erilaisia lääkeaineen kuljettimia tarvitaan, jotta lääkeaineiden toksiset vaikutukset saadaan minimoitua vähentämättä lääkeaineen hoitotehokkuutta. Kuljettimet eivät myöskään saa olla itsessään toksisia.

Viskeraaliseen leishmaniaasiin ei ole tällä hetkellä olemassa tehokasta rokotetta. Erilaisia rokotteita pyritään koko ajan kehittämään, sillä käytössä olevat lääkeaineet ovat toksisia ja aiheuttavat paljon sivuoireita. Henkilöt, jotka ovat sairastaneet viskeraalisen leishmaniaasin, eivät helposti saa uutta infektiota. Tämä viittaa vahvaan immuunijärjestelmän muistiin, jolloin tautiin on mahdollista kehittää myös rokote. Rokotuksen kehittämisessä ongelmana on, että minkään eläinmallin kehittämä infektio ei vastaa ihmisessä kehittyvää infektiota. Tämä asettaa haasteita testattavuudelle ja sitä kautta turvallisen rokotuksen kehittämiselle. (Evans & Kedzierski, 2011).

Rokotteita yritetään kehittää eri tavoilla. Niin kutsutut ensimmäisen linjan rokotteet yritettiin tehdä elävästä tai tapetusta kokonaisesta loisesta. Tällä metodilla oli kuitenkin erittäin epätasaiset tulokset, joten se hylättiin nopeasti. Toinen vaihtoehto on kehittää rokote käyttäen rekombinanttiproteiineja tai esimerkiksi DNA:ta. Kehitetyn rokotemuodon immuniteetti ei kuitenkaan ole pysyvä. Tällä hetkellä lupaavin alue rokotteen kehittämiselle ovat synteettiset peptidit. (Joshi et. al. 2014).

Uusille hoitomuodoille on suuri tarve. Nykyiset hoitomuotona käytettävät lääkeaineet ovat erittäin toksisia ja niitä täytyy käyttää suurina annoksina, jotta tauti paranee. Suuret lääkemäärät kehittävät resistenssin helposti, jolloin erilaisten kombinaatioterapioiden kehittäminen käy haastavaksi ja lääkeaineet eivät enää pure. Viskeraaliseen leishmaniaasiin ei ole olemassa rokotetta, joten hoitokeinoja on kehitettävä jotta loistauti saadaan kuriin. Luettelo hoitomuotona käytettävistä lääkeaineista on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. Viskeraalisen leishmaniaasin hoidossa käytettävät lääkeaineet ja niiden vaikutus lyhyesti

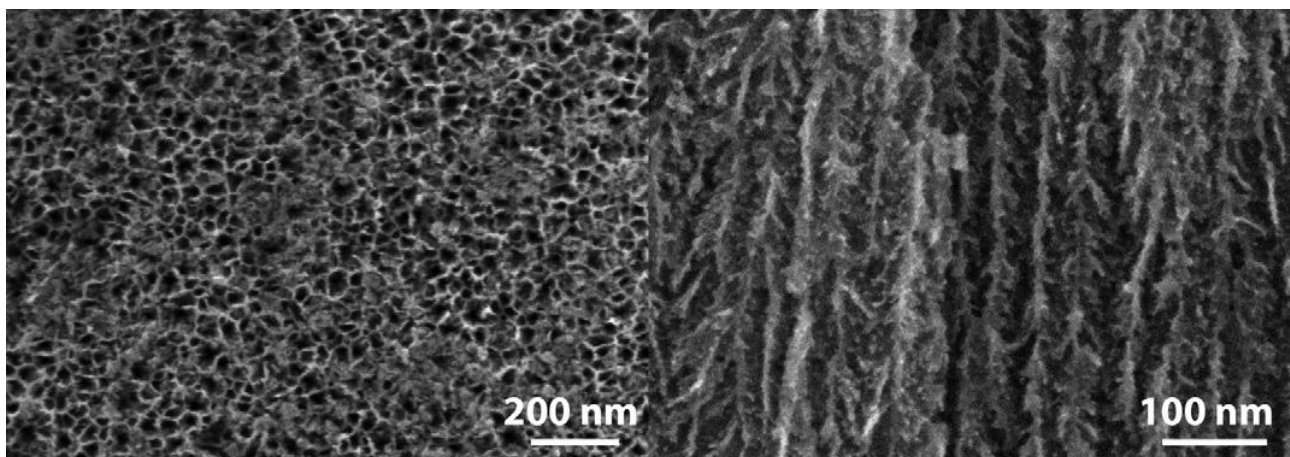
Nimi	Vaikutusmekanismi	Sivuoireet
Pentavalentit antimonit	Estävät rasvojen hapettumista ja häiritsevät solun energia-aineenvaihduntaa	Pahoinvointi, pistoskipu, rytmihäiriöt ja hepatiitti
Pentamidit	Häiritsevät loisen transkriptiokoneiston toimintaa	Pahoinvointi, päänsärky, metallin maku suussa
Miltefosiini	Laukaisee apoptoosin isäntäsolussa jolloin loisen kuolee mukana	Ripuli, oksentelu, teratogeeninen
Paromomysiini	Translaation estäminen sitoutumalla ribosomeihin	Kuulovauriot
Amfoterisiini B	Loisen internalisaation estäminen	Toksisuus munuaisille, injektion jälkeinen kuume ja kalsiumtasojen lasku

## 2.2. Mesohuokoiset piinanopartikkelit

Kiinnostus nanomateriaalien käyttöä kohtaan kasvaa koko ajan. Niiden avulla pystytään yhä enenevässä määrin kehittämään erilaisia menetelmiä esimerkiksi erilaisissa kuljetustehtävissä. Nanomateriaalit ovat hyvin muokattavia ja erilaisia pintamateriaaleja on paljon saatavilla. Ensimmäiset mesohuokoiset piinanomateriaalit löydettiin vuonna 1992. Niiden huokoskokoa voidaan muokata erilaiseksi, jolloin pystytään sääntelemään sitoutuvat lääkeaineen määrää. Mesohuokoisten piinanomateriaalien avulla pystytään viemään kontrolloidusti suuriakin lääkemääriä haluttuun kohteeseen. (Faraji & Wipph, 2009).

### 2.2.1. Rakenne

Mesohuukoiset piinanopartikkelit on valmistettu piilevyistä, joita voidaan muokata erilaisilla menetelmillä siten että levyihin syntyy huokosia. Nämä huokokset ovat mesokokoisia eli niiden huokoskoko on 2-50 nanometriä. (Anglin et. al. 2008). Partikkelikoko voi olla halkaisijaltaan hyvin erilainen: 65-740 nanometriä. Huokokset partikkeleiden pinnalla voidaan valmistaa erilaisiksi: ne voivat olla pyöristettyjä tai teräväreunaisia, toisiinsa yhteydessä tai kokonaan erikseen olevia huokosia. Lisäksi huokosten tiheyttä voidaan säädellä muuttamalla olosuhteita valmistusprosessissa. (Xu et. al. 2012). Mesohuukoisen piin rakenne on esitetty kuvassa 2.



Kuva 2. Mesohuukoisen piin rakenne (nm=nanometriä). (Xu et. al. 2012).

Mesohuukoisia piipartikkeleita voidaan valmistaa kolmella eri etsausmenetelmällä: värjäämällä (engl. stain etching), metalliavusteisella etsauksella (engl. metal assisted etching) tai elektrokemiallisella etsauksella (engl. electrochemical etching). Kaikissa menetelmissä käytetään hyväksi fluorivetyhappoa. (Xu et. al. 2012). Värjäysmenetelmässä fluorivetyhapposeokseen lisätään yleensä typpihappoa. Tämä aiheuttaa kemiallisen hapetus-pelkistysreaktion, jolloin huokokset muodostuvat piilevyjen pinnalle. Tällä menetelmällä saadaan helposti ja nopeasti valmistettua mesohuukoisia piipartikkeleita, mutta reaktion kontrolli on huomattavasti heikompi kuin muissa menetelmissä. Esimerkiksi huokoskokoja ja huokosten määrää ei pystytä muokkaamaan paljoakaan. (Anglin et. al. 2008). Metalliaavusteisessa etsauksessa käytetään kerrostuneita metallilevyjä tai



partikkeleita. Tällä menetelmällä saadaan säädeltyä hieman enemmän, millaisia partikkeleita halutaan valmistaa. (Xu et. al. 2012).

Elektrokemiallinen etsaus on kaikkein tehokkain ja muokattavin valmistusmenetelmä. Tässä menetelmässä huokokset luodaan sähkövirran avulla. Piilevy toimii anodina ja katodina käytetään yleensä platinaa. Sähkövirran avulla luodaan huokokset ja virran annon pituudella ja määrällä voidaan säädellä, millaisia huokosia syntyy. Esimerkiksi mitä kauemmin virtaa pidetään päällä, sitä suurempia huokosia syntyy. Huokosten syntyyn voidaan vaikuttaa myös esimerkiksi happoliuoksen komponenteilla ja virran suuruudella. Piipartikkeleita voidaan muokata myös elektrokemiallisen prosessin jälkeen. Huokoskokoa voidaan kasvattaa lämpötiloja säätelemällä. Piikiekosta saadaan partikkeleita esimerkiksi sonikoimalla. (Xu et. al. 2012). Tällainen muokattavuus on mahdollista vain piipartikkeleille. Muut partikkelimateriaalit eivät ole läheskään yhtä paljon muokattavissa kuin piimateriaalit. Tällainen muokattavuus tekee siitä erinomaisen materiaalin lääkkeiden kuljettamista ajatellen. Lääkeainemolekyylit ovat erikokoisia ja saattavat olla täysin erilaisia kemiallisilta ominaisuuksiltaan. Tällöin kuljetinta tulee pystyä muokkaamaan kuljetettavan lääkeainemolekyylin ominaisuuksien mukaan. (Anglin et. al. 2008).

Mesohuokoinen pii hajoaa ja hapettuu kehossa nopeasti orto-piihapoksi ja poistuu helposti virtsan mukana kehosta. (Park et. al. 2009). Hajoaminen on erittäin nopeata; puoliintumisaika on vain 10 minuuttia. Lääkeaineen kuljettimena tämä aika on liian vähän, sillä partikkeleihin sidottu lääkeaine vapautuu aikaisin, eikä välttämättä päädy kohdekudokseen ollenkaan. Partikkeleiden puoliintumisaikaa voidaan hidastaa kahdella menetelmällä: hapettamalla ja hydrokarbonisaatiolla. Hydrokarbonisaatio pysäyttää hajoamisprosessin ja hapetus hidastaa sitä. Näillä menetelmillä pystytään kasvattamaan puoliintumisaikaa jopa useaan tuntiin. Tällöin lääkeaineet on mahdollista saada vapautettua kohdekudokseen optimaalisessa ajassa ja partikkeli hajoaa vasta kun lääkeaineet ovat vapautuneet. (Hon et. al. 2012).

Partikkelit on tärkeätä saada kohdennettua haluttuun kudokseen. Partikkelit kulkevat verenkierron mukana ja siksi on tärkeätä liittää partikkeleiden pinnalle jokin tunnistusmolekyyl, jotta ne saadaan kulkeutumaan oikeaan paikkaan. Kohdistamisessa käytetään esimerkiksi vasta-aineita. Vasta-aineet voidaan liittää nanopartikkeleiden pinnalle joko suoraan kovalenttisesti tai jonkin välimolekyylin avulla. (Arruebo et. al. 2009). Näiden vasta-aineiden avulla pystytään kohdentamaan nanopartikkelit esimerkiksi makrofageihin. (Faraji & Wipf, 2009).

### 2.2.2. Lääketieteelliset sovellukset

Mesohuukoisia piinanopartikkeleita voidaan hyödyntää monella tavalla. Niiden käyttö teollisuudessa kasvaa koko ajan ja uusia sovellutuksia kehitetään. Tällä hetkellä lääketieteessä suurimmat käyttö- ja kehitysalueet ovat lääkeaineen kuljetuksessa ja diagnosoinnissa.

Mesohuukoiset piinanopartikkelit ovat osittain jo käytössä oleva hoitomuoto syövän hoidossa. Syövän hoito asettaa monia haasteita, sillä usein solut tulevat erittäin resistenteiksi erilaisille lääkeaineille ja toinen suuri ongelma on hoidon kohdentaminen oikeaan kudokseen ilman että terveitä soluja tuhoutuisi. Nanopartikkelit ovat sopivan kokoisia ja niillä on taipumus kerääntyä kohdekudokseen. Syöpäkasvain kehittää ympärilleen verisuoniston, joka on erittäin hauras ja soluseinä vuotaa, eli permeabiliteetti on suuri. Tätä suurta permeabiliteettia hyödynnetään nanopartikkeleita käytettäessä, sillä ne pystyvät pienen kokonsa vuoksi läpäisemään kasvaimen verisuoniston ja pääsemään kasvaimen sisälle. Lisäksi kohdentaminen pahanlaatuisiin soluihin onnistuu edellä mainittujen vasta-aineiden avulla. (Arruebo et. al. 2009).

Syövän hoidossa haasteita asettaa soluille kehittyvä vahva lääkeresistenssi. Suurin vaikuttaja resistenssin kehittymiselle ja sitä kautta lääkeaineiden toiminnan inhibointiin on P-glykoproteiini. (Arruebo et. al. 2009). Kun syöpä on edennyt tarpeeksi pitkälle, syöpäsoluihin kehittyy multiresistenssi, jolloin syövän hoito vaikeutuu huomattavasti. Lääkeaineet, joilla resistenssiä voitaisiin muokata, tarvitaan paljon ja haittana ovat suuret sivuvaikutukset kuten sydämen pysähtyminen. Wang et. al. osoittivat 2014 että lääkeresistenssiä voidaan kiertää mesohuukoisten piinanopartikkeleiden avulla. He tutkivat asiaa multiresistenttien rintasyöpäsolujen avulla ja tuloksena oli kasvaimen pienentyminen rotalla ilman toksisuutta. Resistenssin alenema todettiin johtuvan siitä että nanopartikkelit pystyvät kokonsa ja kulkeutumisensa vuoksi välttämään P-glykoproteiinin avulla tapahtuvaa tunnistusta ja resistenssin kehittymistä. (Wang et. al. 2014).

Aiemmin käytössä olleet mesohuukoiset piinanopartikkelit ovat olleet niin sanottuja monokuljettimia eli ne kuljettavat vain yhtä lääkeainetta kerrallaan. Lisäksi niiden toiminta on syövän hoidossa esimerkiksi hoitavan lääkeaineen toksisuuden alentamista tai passiivisesti kulkeutuminen syöpäkudokseen. Tällä hetkellä kehitetään multifunktionaalisia nanopartikkeleita, jotka pystyvät kuljettamaan ja vapauttamaan useaa lääkeainetta yhtä aikaa. Meng et. al. osoittivat 2015 että haimasyövän hoidossa käytettävä multifunktionaalinen mesohuukoinen piinanopartikkeli pystyi merkittävästi pienentämään kasvainta ja paranemisprosentti rotilla oli huomattavasti

suurempi. Tässä tutkimuksessa käytettiin kahden lääkeaineen kombinaatiota: gemcitabinaa joka alentaa syöpäkudoksen tiiviyyttä ja paclitaxelia, joka puolestaan on syöpäsoluja tappava lääkeaine. (Meng et. al. 2015). Luo et. al. pystyivät vuonna 2014 ensimmäistä kertaa kohdentamaan multifunktionaalisia piinanopartikkeleita myös syöpäsolujen sisälle. Toinen partikkeleihin sidottu lääkeaine kohdensi partikkelit soluihin ja toinen lääkeaine kohdennettiin suoraan mitokondrioihin. Partikkeleiden pintavarausta muokattiin positiiviseksi jolloin ne pääsevät helpommin negatiivisesti varautuneiden solukalvojen läpi syöpäsoluihin. Mitokondriot ovat solujen aineenvaihdunnasta vastaavia organelleja, mutta myös ohjelmoidun solukuoleman aloituskeskuksia. Tähän mekanismiin vaikuttaminen aiheuttaa ohjelmoidun solukuoleman, joka on peruuttamaton. Näin pystytään tuhoamaan syöpäsoluja luonnollisella menetelmällä. (Luo et. al. 2014).

Mesohuokoiset piinanopartikkelit ovat hyviä kuljettimia kun halutaan saada suuria määriä lääkeainetta kuljetettua kohdekudokseen. Partikkeleita hyödynnetään paljon myös huonosti liukenevien lääkeaineiden kuljettamisessa. Nämä lääkeaineet olisivat muuten hankalasti vietävissä hoidettavaan kohdekudokseen. Esimerkiksi Mohseni et. al. osoittivat 2014 että tuberkuloosiin käytettävää lääkeainetta Rifampinia saadaan nanopartikkeleiden avulla kuljetettua keuhkoihin helpommin, sillä Rifampin on erittäin huonosti liukeneva lääkeaine. (Mohseni et. al. 2014).

Kuvantaminen on toinen alue, missä mesohuokoisia piinanopartikkeleita voidaan hyödyntää erinomaisesti. Piinanopartikkeleiden hyviä ja uniikkeja ominaisuuksia ovat muokattavuus ja sitä kautta suuri huokosten määrä ja hyvät optiset ominaisuudet. Näitä ominaisuuksia hyväksikäyttäen on kehitetty paljon esimerkiksi erilaisia sensoreita ja mittauslaitteita. Kuten edellä on mainittu, piinanopartikkeleita voidaan kohdentaa erilaisilla molekyyleillä kohdekudoksiin ja suuren latausasteen (engl. loading degree) avulla partikkeleihin voidaan ladata paljon haluttua tunnistusmolekyyliä. Piinanopartikkelit poistuvat luonnollista reittiä, joten kuvantaminen niiden avulla on turvallisempaa kuin monella muulla menetelmällä. Fluoresenssin hyödyntäminen on yksi käyttösovellus kuvantamisessa. (Slowing et. al. 2007). Hyviä kuvantamisominaisuuksia voidaan hyödyntää myös lääkeaineiden kohdentamisessa. Kuvantamisen avulla voidaan seurata lääkeaineen kulkua ja tarkkailla, päätyykö se kohdekudokseen. Park et. al. tutkivat näitä ominaisuuksia rotilla hyödyntäen luminesenssia. Luminesenssin avulla todettiin että lääkeaineet päätyivät oikeaan paikkaan ja vapautuivat halutussa aikaikkunassa. (Park et. al. 2009).

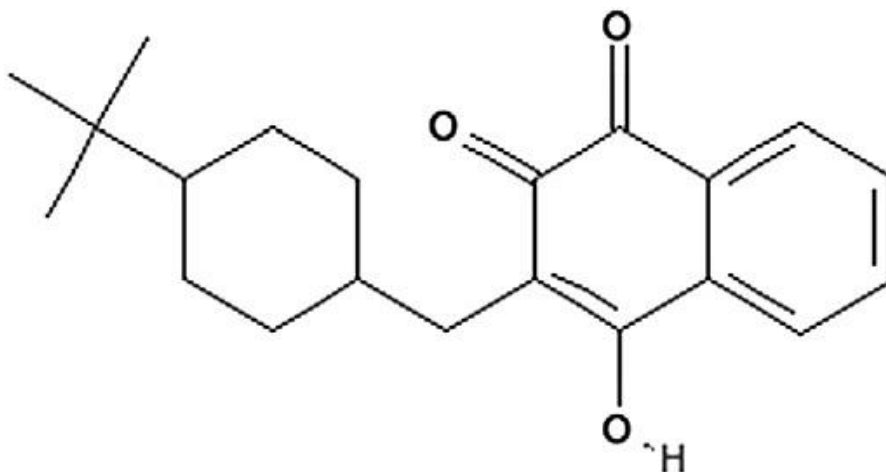
Muita sovellusalueita ovat esimerkiksi rokotteissa käytettävät partikkelit ja melko uutena alueena lisääntymisteknologiassa käytettävät partikkelit. Rokotteissa mesohuokoisia piinanopartikkeleita käytetään kuljettimena, jolloin vasta-aine on sidottu nanopartikkelin pinnalle. Kuljettimena

toimiessa nanopartikkelit vievät halutun antigeenin esimerkiksi immuunijärjestelmän soluihin jolloin antigeeni luo muistijäljen antigeenistä. Partikkeleita voidaan myös käyttää aktivoimaan yleisesti immuunijärjestelmää, jolloin halutun antigeenin immunogeenisyys eli muistijäljen kehittyminen on voimakkaampaa. (Zhao et. al. 2013). Lisääntymisteknologiassa mesohuukoisia piinanopartikkeleita ei ole vielä lääketieteellisessä käytössä, mutta kehitystyötä tehdään jatkuvasti. Partikkeleita voitaisiin hyödyntää esimerkiksi geeniterapiassa tai alkioden leimaamisessa, jotta voitaisiin seurata niiden kiinnittymistä kohtuun. (Barkalina et. al. 2014).

Mesohuukoilla piinanopartikkeleilla on paljon erilaisia käyttösovelluksia jo tälläkin hetkellä käytössä ja uusia menetelmiä kehitetään koko ajan. Uniikit ominaisuudet kuten suuri muokattavuus ja erilaisten molekyylien liitettävyyys partikkeleiden pinnalle tekevät niistä hyviä kandidaatteja lääketieteen käyttöön. Monet hoitomuodot, esimerkiksi syövän hoito, ovat erittäin raskaita ja tuhoavat paljon myös elävää ja tervettä kudosta. Kohdennettavien partikkeleiden avulla voidaan löytää hoitokeinoja ja terapiamuotoja moniin sairauksiin.

### 2.3. Buparvaquone

Buparvaquone (BPQ) on hydroksinaftokinoni, jota on käytetty pitkään lääkeaineena karjassa esiintyvää theilerioosia vastaan. Kyseinen tauti on loisen aiheuttama infektio, joka leviää punkkien pureman välityksellä. (Garnier et. al. 2007). BPQ:n kemiallinen rakenne on esitetty kuvassa 3. BPQ:n aktiivisuus leismaniaasia kohtaan havaittiin yli 20 vuotta sitten ja sen on havaittu toimivan myös muita loisia vastaan. Sen toimintamekanismi solussa ei ole täysin selvillä, mutta sen on arvioitu vaikuttavan esimerkiksi vapaiden happiradikaalien syntyyn. Vapaiden happiradikaalien avulla tuhotaan erilaisia vieraita aineita tai eliöitä soluissa. Toinen mahdollinen toimintamekanismi on vaikuttaa elektroniinsiirtoketjuun ja sitä kautta solun aineenvaihduntaan. (Mäntylä et. al. 2004). BPQ:n toksisuutta määritettäessä on havaittu sen olevan toksinen juuri muodostamalla happiradikaaleja, jotka monissa tapauksissa aiheuttavat ohjelmoitua solukuolemaa. (Guo et. al. 2012).



Kuva 3. Buparvaquonen kemiallinen rakenne. (Reimão et. al. 2012).

BPQ liukenee erittäin huonosti veteen ja sen kehoon saaminen on hankalaa. Alhainen veteen liukeneminen hankaloittaa oikeanlaisen vaikutuksen saamista, sillä suurin osa kehon nesteistä on suurimmaksi osaksi vettä. Tätä varten on pyritty kehittämään hyviä kuljetusmenetelmiä, jotta BPQ saadaan vietyä soluihin sisälle. Tällä hetkellä kuljetusmetodina käytetään liposomeja, mutta niihin ei saada ladattua niin suurta määrää lääkeainetta ja lääkeaine ei imeydy kovinkaan tehokkaasti. (Reimão et. al. 2012).

Reimão et. al. havaitsivat 2012 että *in vitro*-kokeissa BPQ toimi erittäin hyvin amastigootteja vastaan, mutta *in vivo* vapaa BPQ ei päässyt maksaan, jolloin hamsterit eivät reagoineet lääkeaineeseen. (Reimão et. al. 2012). Samanlaiseen tulokseen päätyivät myös Garnier et. al. 2007: hiiriä hoidettaessa lääkeaineen tehokkuus ei ollut riittävä, sillä lääkeaine vaikutti erittäin epätasaisesti populaatiossa. (Garnier et. al. 2007). Tämä viittaisi siihen, että tarvitaan tehokkaampia kuljetusmenetelmiä lääkeaineen saamiseksi kohdekudokseen.

### 3. Työn tarkoitus

Työn tarkoituksena oli tutkia nanopartikkeleiden internalisaatiota soluihin eri aikapisteissä, sekä optimoida olosuhteet ja käytettävän nanopartikkelin määrä. Lisäksi tarkoituksena oli selvittää, ovatko kyseiset partikkelit tai niissä käytettävä lääkeaine buparvaquone toksinen soluille.

## 4. Materiaalit ja menetelmät

### 4.1. Solujen ylläpito

Tutkimuksessa käytettiin solulinjana RAW 264.7 –makrofageja. Kyseessä on hiirestä eristetty solulinja. Soluja viljeltiin 10 cm<sup>2</sup> maljoilla ylläpidossa ja kasvatusliuoksena oli Dubblecco's Modified Eagle Medium. Lisukkeina liuoksessa käytettiin antibioottia (penisilliini-streptomysiini, 100 U/ml) ja 10 % lämpökäsiteltyä naudan sikiön seerumia (engl. FBS=fetal bovine serum).

### 4.2. Käytetyt nanopartikkelit

Partikkelit kokeita varten tuotti sovelletun fysiikan laitos (Itä-Suomen yliopisto). Käytetyt nanopartikkelit oli stabiloitu karbonisaatiolla ja karbonoidut partikkelit aktivoitiin happoryhmällä (UnTHCPSi-COOH). Tämä aktivointi mahdollistaa ja helpottaa erilaisten molekyylien liittämisen nanopartikkelien pinnalle. Tässä työssä tutkittiin miten erilaisten proteiinien konjugaatio nanopartikkeleiden pinnalle vaikuttaa partikkeleiden internalisaatioon. Käytettyjä proteiineja olivat avidiini, streptavidini ja immunoglobuliini G (IgG). Avidiinia eristetään kananmunasta, streptavidini on bakteereista löytyvä tetrameerinen proteiini ja immunoglobuliinit ovat elimistössä esiintyviä vasta-aineita. Tässä työssä käytettiin jäniksestä eristettyä IgG:tä. Kontrollina toimi naudan seerumin albumiini (engl. BSA=bovine serum albumin). Partikkeleihin kiinnitetyt proteiinit oli leimattu FITC-värillä fluoresenssin tarkkailun mahdollistamiseksi. Lisäksi kokeiltiin avidiini-konjugoitua partikkelia, jossa oli biotinyloitu IgG pinnalla kiinni.

Proteiinien konjugoinnista ja lääkeaineen latauksesta vastasi Rinez Thapa (Kemian laitos, Itä-Suomen yliopisto). Käytettyjen partikkelien ominaisuudet (konjugaatio, partikkelin koko ja lääkeaineen latausaste) on esitetty taulukossa 2. Kaikki käytetyt proteiinit oli FITC-leimattuja ennen konjugointia. IgG konjugoitiin ensin FITC-leimattuun BSA:han sekoittamalla sitä huoneen lämmössä tunnin ajan painosuhteessa 1:2. Tämän jälkeen IgG+BSA-FITC konjugoitiin partikkeleihin (ABNP4) sekoittamalla proteiinia ja partikkeleita painosuhteessa 1:5 tunnin ajan huoneen lämpötilassa. Avidiini ja streptavidini konjugoitiin partikkeleiden pintaan sekoittamalla

niitä partikkelien kanssa painosuhteessa 1:2 huoneen lämpötilassa tunnin ajan. Partikkelia (joko ABNP11 tai 13) oli 1 mg ja proteiinia 1 mg/200µl. Sekoituksen jälkeen partikkelit pestiin vedellä proteiiniylimäärän poistamiseksi.

Internalisaatiota tutkittiin sekä partikkeleilla ilman lääkeainetta että lääkeaineella ladatuilla partikkeleilla. Käytetty lääkeaine oli buparvaquone. Partikkelit suspensoitiin 1 ml:an etanolia ja sonikoitiin. Sonikoinnin jälkeen 500 µg buparvaquonea sekoitettiin 500 µl:an proteiinisuspensiota ja sonikoitiin uudestaan. Sonikoinnin jälkeen suspensiota sekoitettiin kahden tunnin ajan huoneen lämpötilassa. Sekoituksen jälkeen suspensio sentrifugoitiin ja partikkelit kerättiin.

Taulukko 2. Internalisaatiokokeissa käytettyjen nanopartikkeleiden ominaisuudet

Partikkelin koodi	Konjugaatio	Nanopartikkelin koko (halkaisija nm)	Lääkeaineen latausaste (w/W)
ABNP 4	IgG-FITC	249	13 %
ABNP 11	Streptavidini-FITC	205	9 %
ABNP 13	Avidiini-FITC	214	8 %

#### 4.3. Internalisaatiokokeet

Internalisaatiokokeet suoritettiin 8-kuoppalevyllä (Lab-Tek chambered #1.0 Borosilicate Coverglass system, Thermo Fischer). Soluja laitettiin 200 000 solua/kuoppa ja annettiin kiinnittyä yön yli levyille. Partikkelikokeet tehtiin kasvatusliuoksessa ja testattiin kolmea partikkelikonsentraatiota: 100 µg/ml, 50 µg/ml ja 10 µg/ml. Myöhemmissä vaiheissa käytettiin ainoastaan konsentraatiota 10 µg/ml. Internalisaatiota testattiin kolmessa eri aikapisteessä, jotta pystyttäisiin näkemään internalisaation nopeus. Aikapisteet olivat 1 tunti, 4 tuntia ja 24 tuntia. Inkuboinnin jälkeen soluista leimattiin lysosomit 50nM LysoTracker®-värillä (Life Technologies) ja tumat 10 µg/ml Hoesch-

värillä. Leimaamisen jälkeen nanopartikkeleiden internalisaatiota tarkkailtiin konfokaalimikroskoopin avulla (Zeiss LSM 700).

#### 4.4. Nanopartikkeleiden toksisuusmittaukset

Nanopartikkeleiden ja niihin sidotun lääkeaineen toksisuutta testattiin solujen elävyytestillä (CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay, Promega). Elävyystestaus suoritettiin 96-kuoppalevyllä. Solumäärä oli 5000 solua/kuoppa. Määritykseen otettiin neljänlaista partikkelia: BSA-konjugoitu ilman lääkeainetta, BSA-konjugoitu lääkeaineen (BPQ) kanssa, avidiini-konjugoitu ilman lääkeainetta ja avidiini-konjugoitu lääkeaineen (BPQ) kanssa. Partikkeleiden pitoisuus testissä oli 10 µg/ml. Lisäksi testattiin vapaan lääkeaineen (BPQ) toksisuutta usealla konsentraatiolla: 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2 µg/ml ja 1 µg/ml. Kustakin partikkeli- ja lääkeainekonsentraatiosta tehtiin neljä rinnakkaista kuoppaa. Inkubointiaika oli 24 tuntia, jonka jälkeen kuopat pestiin kaksi kertaa kasvatusliuoksella lääkeaineen ja partikkeleiden jäämien poistamiseksi. Solujen annettiin kasvaa vielä 24 tuntia jolloin nähtiin toksisuuden vaikutus kasvuvauhtiin. Positiivisena kontrollina oli vesi ja negatiivisena kontrollina Triton-X.

#### 4.5. Nanopartikkeleiden testaus *L. donovani* –amastigootteihin

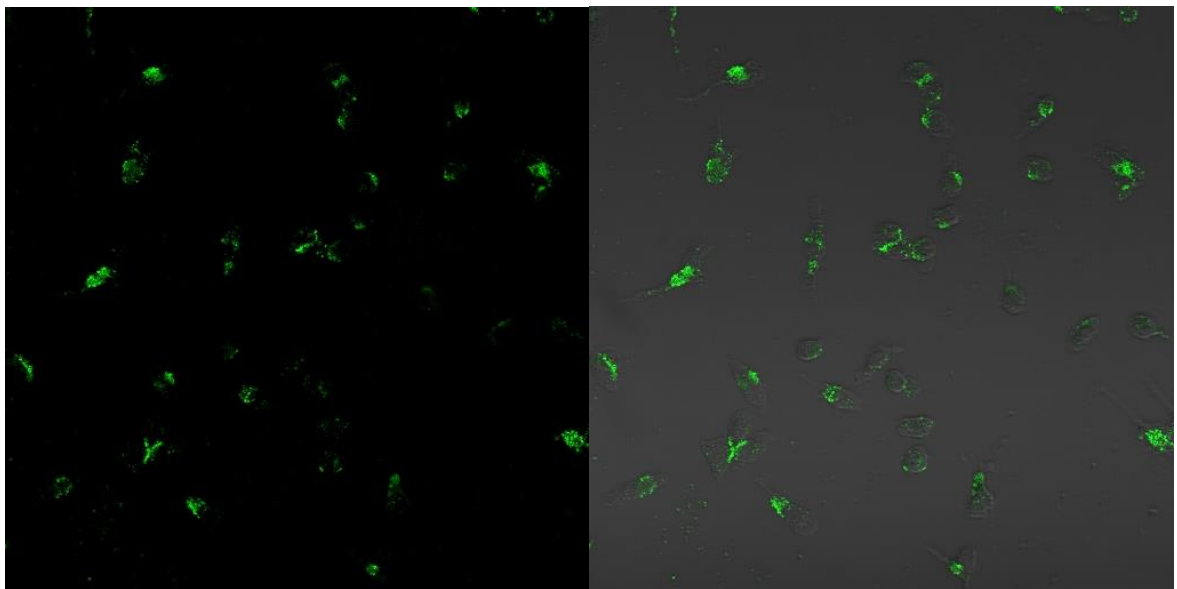
Internalisaatiokokeiden tulosten pohjalta tutkittiin nanopartikkeleihin sidotun lääkeaineen vaikutusta amastigootteihin. Testit suoritettiin Jawaharlal Nehrun yliopistossa New Delhissä. Testissä käytettiin hiiren makrofagisolulinjan J77A.1 soluja, jotka oli infektoitu *L. donovani* –amastigootteilla. Käytetyt nanopartikkelit olivat joko BSA- tai avidiini-konjugoituja. Partikkeleiden vaikutusta testattiin kolmella eri konsentraatiolla: 2,5 µg/ml, 6,25 µg/ml ja 12,5 µg/ml. Kokeiden suorittamisesta vastasi Madhubala Rentala ja Rati Tandon.



## 5. Tulokset

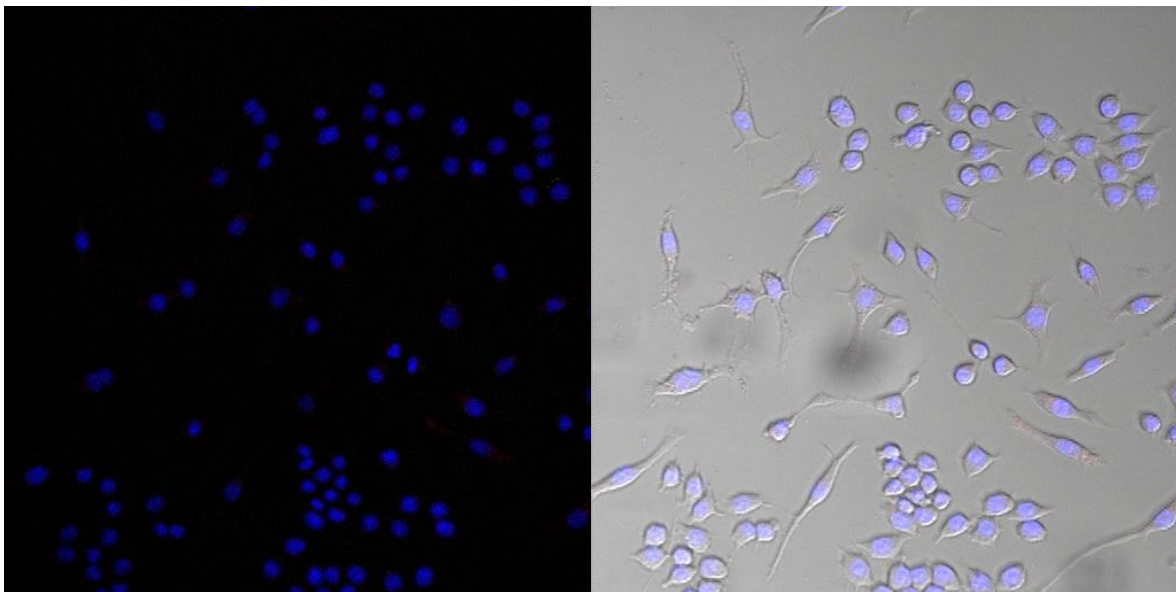
### 5.1. Internalisaatiokokeet

Partikkelin pintaan konjugoitu proteiini vaikutti internalisaation vahvuuteen ja fluoresenssin näkymiseen. Partikkelia ABNP13 käytettäessä (joko biotinyloidun IgG:n kanssa tai ilman) havaittiin eroa myös eri aikapisteiden välillä. Kuvassa 4 on esitetty streptavidiinilla pinnoitetun partikkelin (ABNP11) internalisaatiota. Partikkeleissa ei ollut lääkeainetta ladattuna. Inkubointiaika oli tässä kokeessa 24 tuntia. Internalisaatiota oli hyvin selkeätä, mutta osa partikkeleista oli kerääntynyt myös solujen pinnalle tai lasilevyn pohjaan. Tämän voimakkaan aggregaation (kerääntymisen) vuoksi ei tehty muita aikapisteitä. Vasemmassa kuvassa näkyy pelkkä fluoresenssi ja oikeassa kuvassa on sekä fluoresenssi että normaali valotie. Kuvista havaittiin että solujen morfologia säilyi normaalina internalisaatiokokeesta huolimatta.



Kuva 4. Streptavidiinilla konjugoitujen partikkelien (ABNP11) internalisaatio 24 tunnin inkuboinnin jälkeen. Näissä partikkeleissa ei ollut lääkeainetta mukana. Vasemmassa kuvassa näkyy pelkkä fluoresenssi ja oikeassa kuvassa näkyy normaali valo fluoresenssin lisäksi.

IgG –vasta-aineella konjugoiduilla partikkeleilla (ABNP4) ei havaittu partikkelien internalisaatiota. Kuvassa 5 on esitetty mikroskooppikuvat näiden partikkelien internalisaatiosta neljän tunnin inkuboinnin jälkeen. Partikkeleissa ei ollut lääkeainetta mukana. Tumat oli värjätty Hoesch-väriaineella ja ne näkyvät sinisinä alueina kuvassa. Vasemman puoleisessa kuvassa on esitetty sininen valo ja fluoresenssi. Tästä kuvasta havaittiin että partikkeleita ei näkynyt lainkaan, ei solujen pinnalla eikä lasilevyn pohjalla. Oikean puoleisessa kuvassa näkyy lisäksi normaali valotie. Solujen morfologiassa ei havaittu muutoksia kokeen aikana.

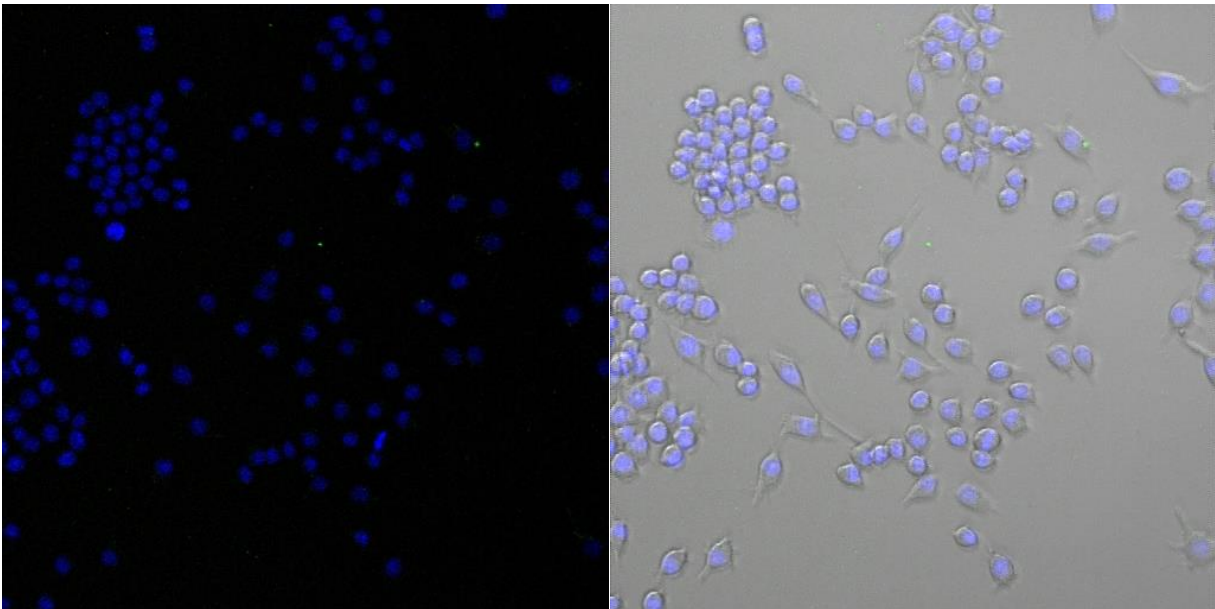


Kuva 5. IgG –vasta-aineella konjugoidut partikkelit (ABNP4). Siniset alueet ovat Hoesch-värillä leimattuja tumia.

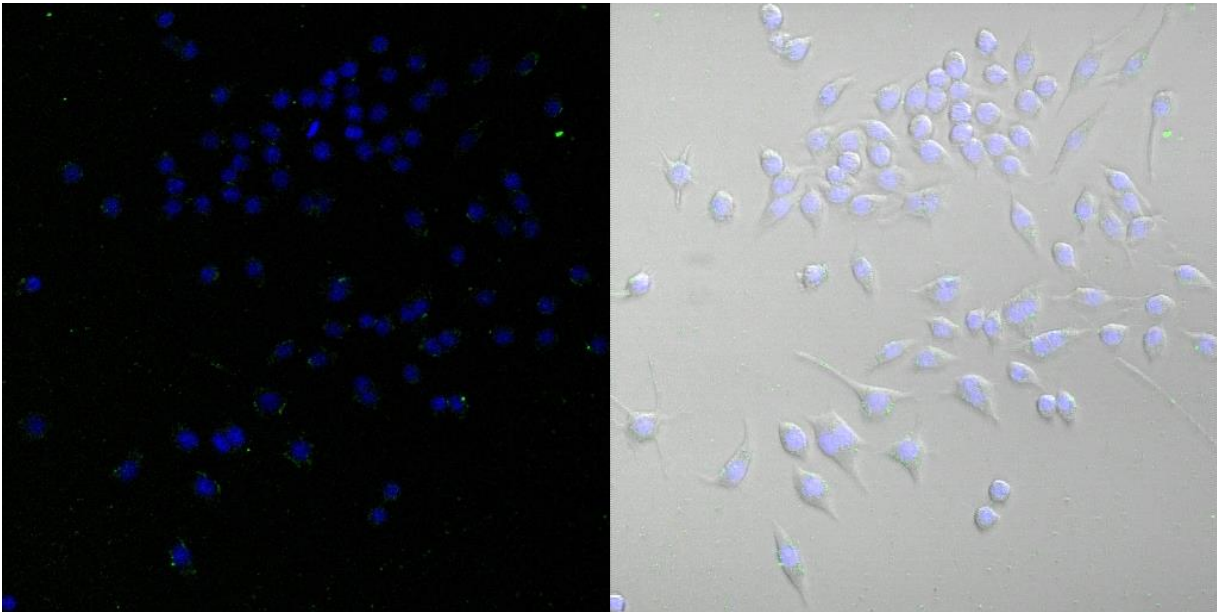
Kuvissa 6a, b ja c on esitetty avidiinilla konjugoitujen partikkelien (ABNP13) internalisaatiotulokset. Kaikissa kuvissa on käytetty samaa partikkelia (ABNP13) ja näihin partikkeleihin oli ladattu lääkeainetta. Kuvassa 6a on esitetty tilanne yhden tunnin inkuboinnin jälkeen, kuvassa 6b neljän tunnin inkuboinnin jälkeen ja kuvassa 6c 24 tunnin inkuboinnin jälkeen. Erot internalisaatiossa olivat selvästi nähtävissä eri aikapisteiden välillä. Kuvassa 6a vasemman puoleisessa kuvassa näkyy sininen valo ja fluoresenssi. Kuvassa näkyy Hoesch-värjättyjen tumien lisäksi muutamassa paikassa solujen sisällä nanopartikkeleita. Vasemman puoleisesta kuvasta

nähdään että solujen morfologia on normaali ja että partikkeliä on solun sisällä. Solujen morfologiassa ei ollut muutoksia missään aikapisteessä.

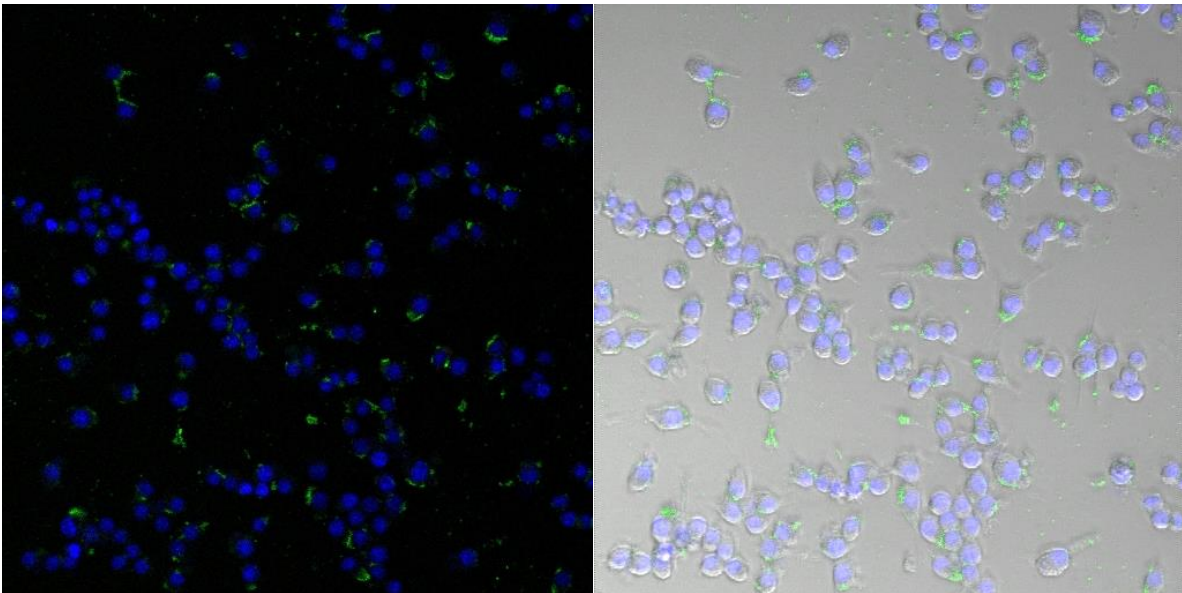
Kuvassa 6b on havaittavissa selvästi enemmän internalisaatiota kuin kuvassa 6a. Partikkeleita ei kuitenkaan ole keräytynyt lasilevyn pohjalle tai solujen pinnalle. Kuvasta 6b (oikea puoli) nähdään myös että partikkeleita on eri puolilla solua. Aggregoitumista ei ollut havaittavissa. Kuvassa 6c näkyy internalisaation lisäksi myös partikkeleiden kerääntymistä lasilevyn pohjalle. Partikkelit ovat osittain kerääntyneet solujen pinnalle, mutta myös internalisaatio on erittäin selkeästi nähtävissä. Solujen morfologia on säilynyt aggregaatiosta huolimatta normaalina.



Kuva 6a. Avidiini-konjugoidut partikkelit yhden tunnin inkuboinnin jälkeen. Siniset alueet ovat Hoesch-värillä leimattuja tumia ja nanopartikkelit vihreitä pisteitä.



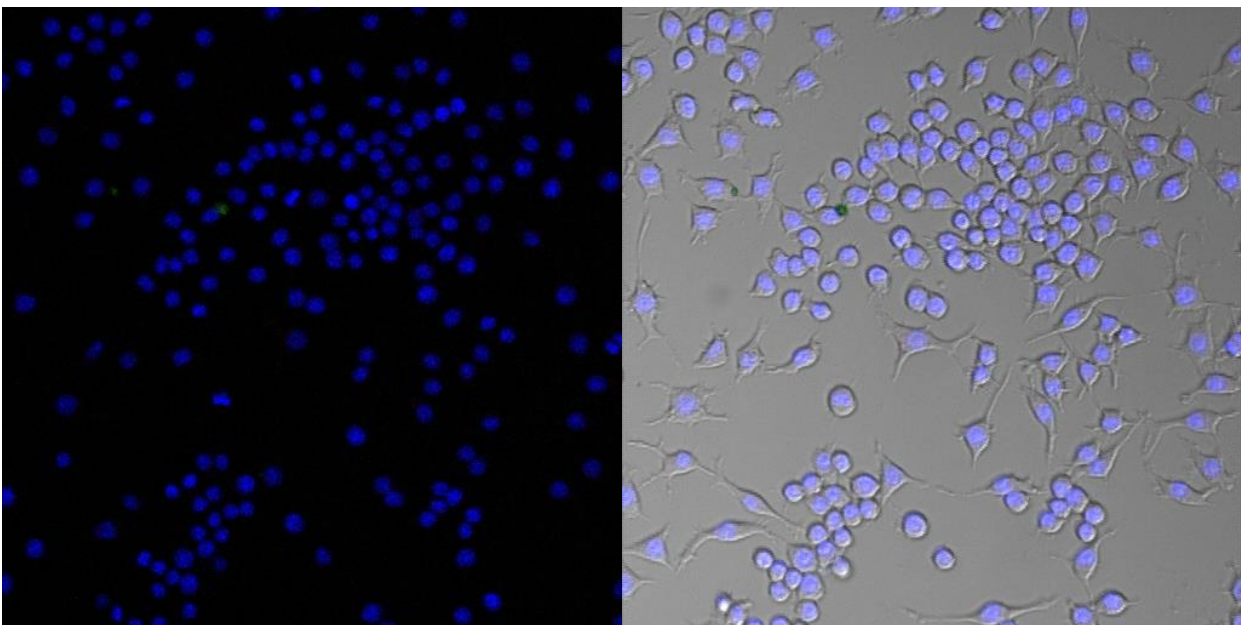
Kuva 6b. Avidiini-konjugoidut partikkelit neljän tunnin inkuboinnin jälkeen. Siniset alueet ovat Hoesch-värillä leimattuja tumia ja vihreät pisteet ovat nanopartikkeleita.



Kuva 6c. Avidiini-konjugoidut (ABNP13) nanopartikkelit 24 tunnin inkuboinnin jälkeen. Siniset alueet ovat Hoesch-värillä leimattuja tumia ja nanopartikkelit ovat vihreitä pisteitä.

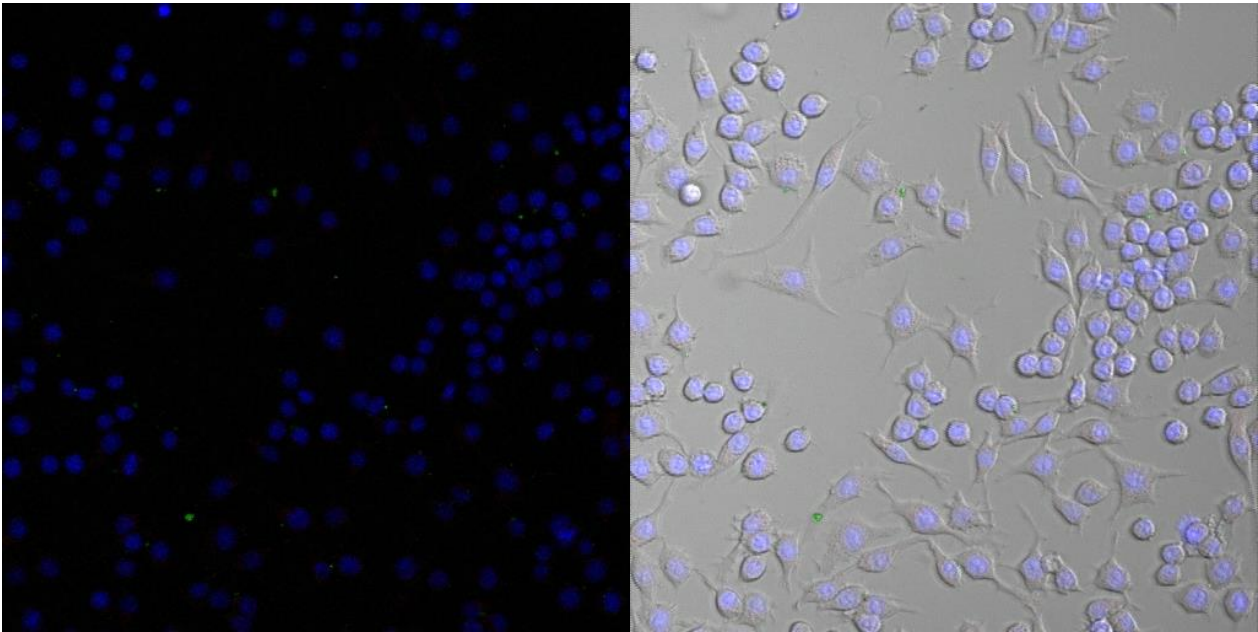
Kuvissa 7a, b ja c on esitetty avidiini-konjugoidut partikkelit (ABNP13), joihin on lisäksi liitetty biotinyloitu IgG. Kaikissa kuvissa on käytetty samaa partikkelia (ABNP13). Havaittiin että biotinyloidun IgG:n kanssa fluoresenssi ja internalisaatio olivat huomattavasti heikompia kuin pelkän avidiinin kanssa kaikissa aikapisteissä. Kuvassa 7a on esitetty tilanne yhden tunnin inkuboinnin jälkeen, kuvassa 7b neljän tunnin jälkeen ja kuvassa 7c 24 tunnin inkuboinnin jälkeen. Kuvasta 7a nähdään että internalisaatio on erittäin vähäistä. Vasemman puoleisessa kuvassa näkyy sininen valo ja fluoresenssi, josta havaitaan muutamissa kohdissa partikkeleita. Oikean puoleisesta kuvasta nähdään että näkyvät partikkelit ovat internalisoituneet solujen sisälle.

Kuvassa 7b, neljän tunnin inkuboinnin kohdalla, näkyy jo selvästi enemmän internalisaatiota. Vasemmassa kuvassa, jossa on esitetty fluoresenssi, näkyy partikkelia useassa kohdassa, mutta internalisaatio on huomattavasti vähäisempää kuin pelkän avidiinin kanssa neljän tunnin aikapisteessä. 24 tunnin inkuboinnin jälkeen ei havaittu juurikaan internalisaatiota. Tämä näkyy kuvassa 7c. Vasemman puoleisesta kuvasta ei nähdä fluoresenssia kuin yhdessä kohdassa. Oikean puoleisesta kuvasta havaitaan että nämä partikkelit ovat internalisoituneet soluihin.

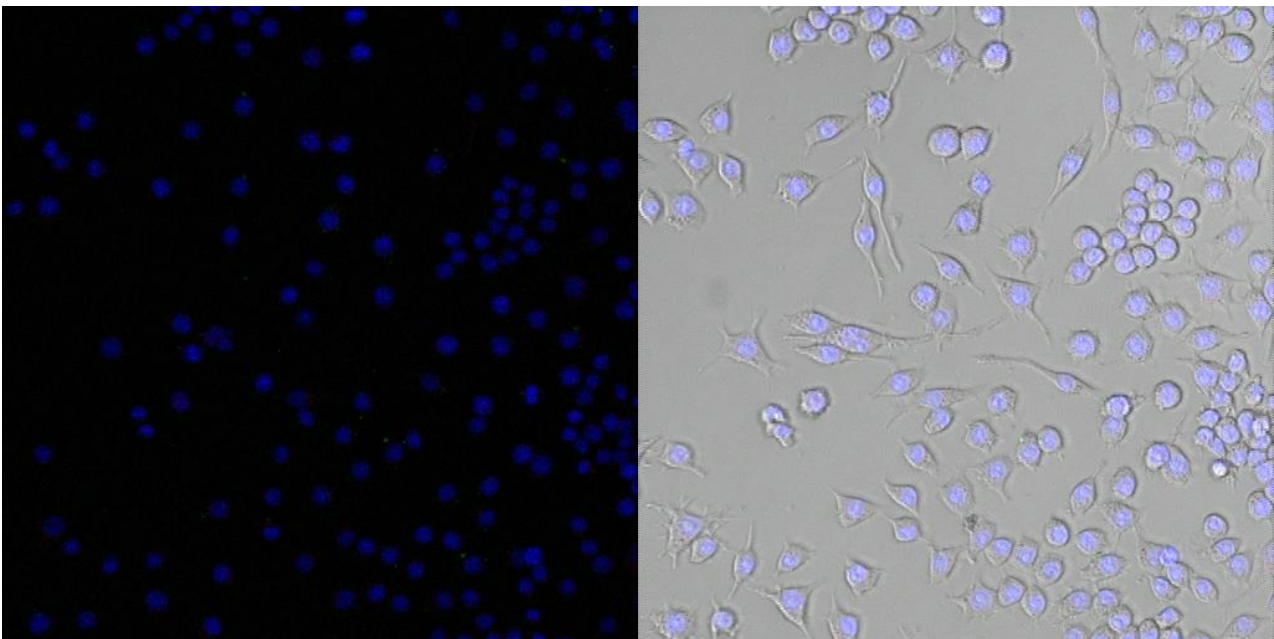


Kuva 7a. Avidiini-konjugoidut partikkelit, joihin on liitetty biotinyloitu IgG. Inkubointiaika oli yksi tunti. Siniset alueet ovat Hoesch-värillä leimattuja tumia ja vihreät pisteet nanopartikkeleita.





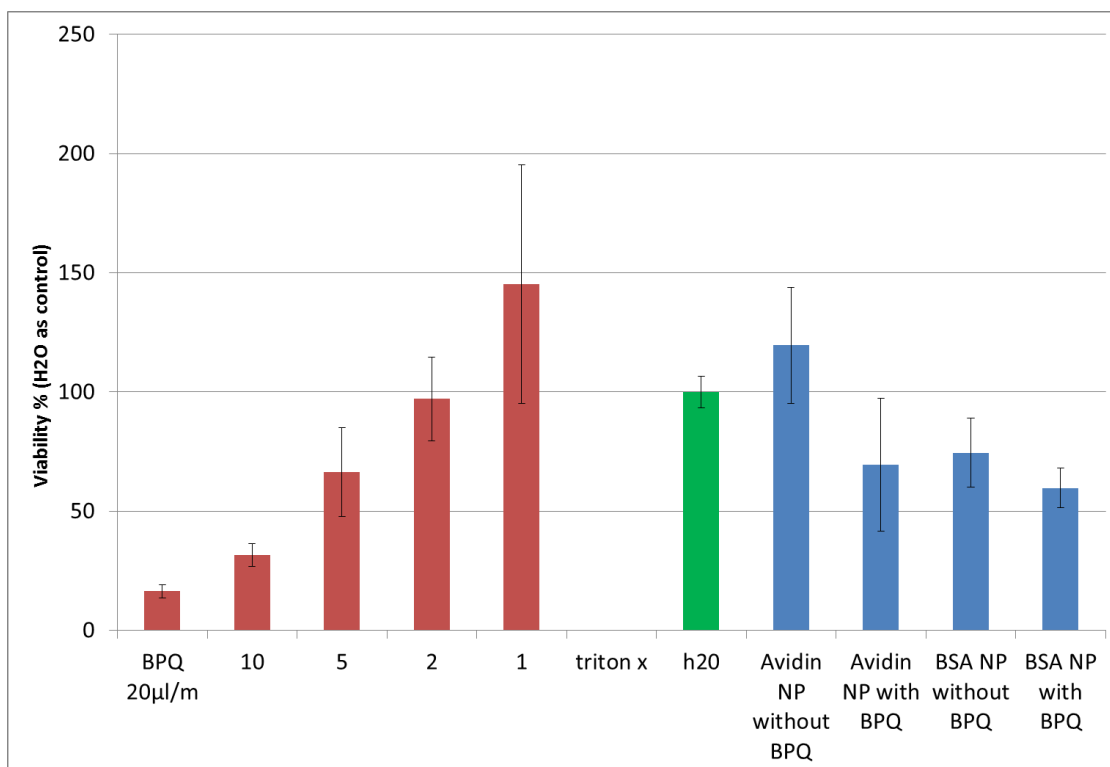
Kuva 7b. Avidiini-konjugoidut partikkelit, joihin on liitetty biotinyloitu IgG. Inkubointiaika oli neljä tuntia. Siniset alueet ovat Hoesch-värillä leimattuja tumia ja vihreät pisteet ovat nanopartikkeleita.



Kuva 7c. Avidiini-konjugoidut nanopartikkelit, joihin on liitetty biotinyloitu IgG. Inkubointiaika oli 24 tuntia. Siniset alueet ovat Hoesch-värillä leimattuja tumia ja vihreät pisteet nanopartikkeleita.

## 5.2. Nanopartikkeleiden toksisuusmittaukset

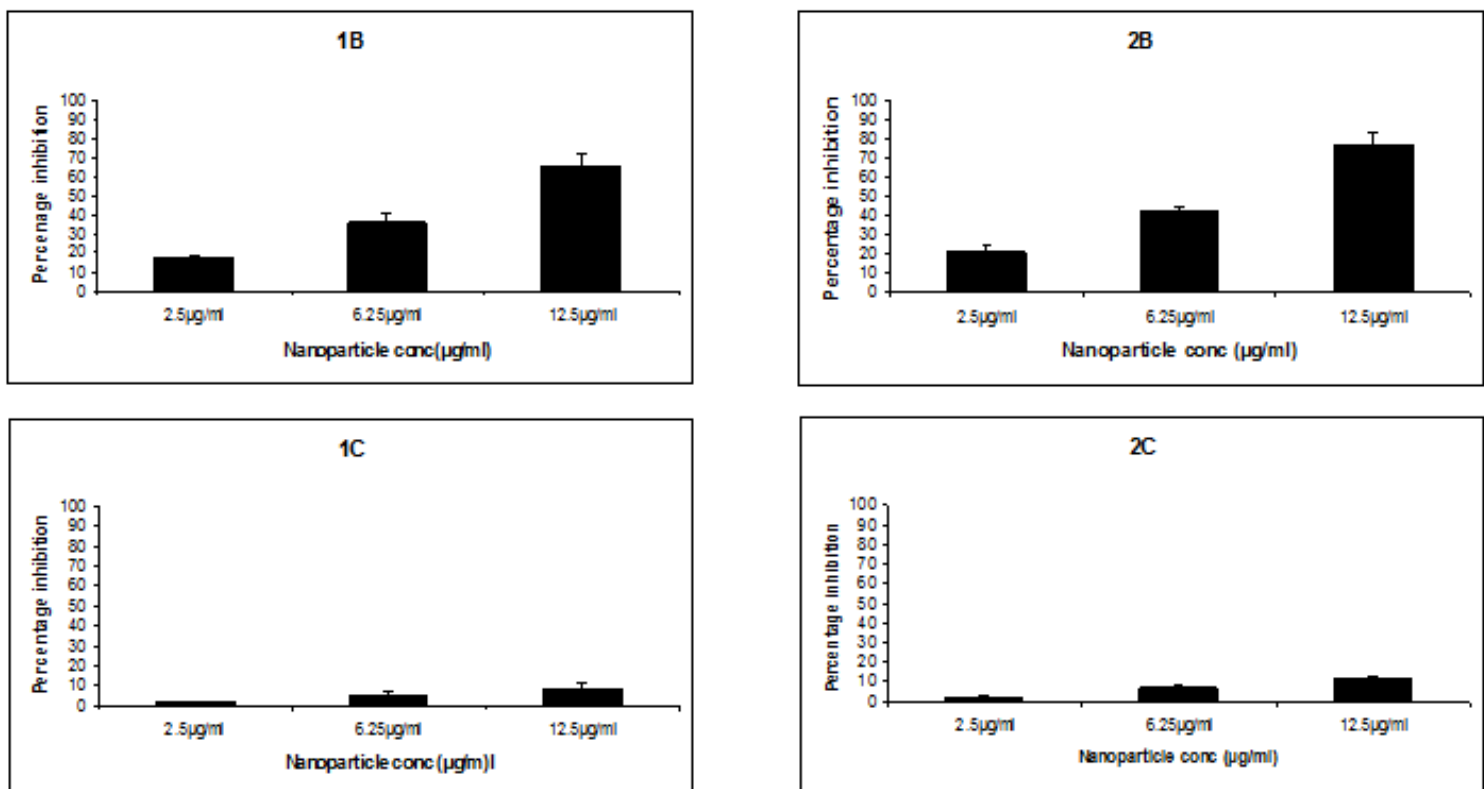
Piinanopartikkeleiden toksisuus testattiin solujen elävyydestillä. Samassa testissä testattiin myös vapaan buparvaquonen toksisuus soluille. Kuvan 8 kaaviossa on esitetty elävyydestin tulokset. Vesi oli positiivikontrolli ja Triton-X negatiivikontrolli. Elävyyssprosentti on laskettu verrattuna veden kanssa inkuboituihin soluihin. Kaavion tuloksista nähdään että suuri konsentraatio vapaata buparvaquonea tappaa soluja, mutta pienemmillä konsentraatioilla elävyys on jopa parempi kuin kontrolleissa. Nanopartikkelit, joissa ei ollut lääkeainetta, eivät ole toksisia soluille, sillä niiden elävyyssprosentti on hyvin lähellä tai jopa yli positiivikontrollin. Lääkeaineella ladatut partikkelit vaikuttivat enemmän solujen kasvuun, mutta elävyyssprosentti oli silti yli 50 %.



Kuva 8. Elävyydestin tulos. Vesi oli positiivikontrolli ja Triton-X negatiivikontrolli. Elävyyssprosentit on laskettu vertaamalla elävyyksiä positiivikontrolliin.

### 5.3. Nanopartikkeleiden testaus *L. donovani* -amastigootteihin

Internalisaatiokokeiden pohjalta partikkeleihin sidotun lääkeaineen vaikutusta testattiin amastigootteilla infektoituihin makrofageihin. Tulokset kokeista on esitetty kuvassa 9. Paras inhibitioprosentti amastigootteille oli avidiini-konjugoidulla partikkelilla, johon oli ladattu buparvaquonea. Tulos on esitetty kuvassa 9 kohdassa 1B. Inhibitioprosentti oli konsentraatiolla 12,5 µg/ml 76 %. Kohdassa 2B näkyy BSA-konjugoidun partikkelin aiheuttama inhibitio, joka oli konsentraatiolla 12,5 µg/ml 65 %. Kohdissa 1C ja 1B on esitetty kummastakin, sekä avidiini-konjugoidusta että BSA-konjugoidusta tyhjien partikkelien vaikutus amastigootteihin. Molemmissa tapauksissa inhibitio on alle 10 %.



Kuva 9. Nanopartikkelien inhibitioaktiivisuus solunsisäisiä amastigootteja kohtaan. 1B=avidini-konjugoitu partikkeli BPQ:n kanssa, 1C=avidini-konjugoitu partikkeli ilman BPQ:a, 2B=BSA-konjugoitu partikkeli BPQ:n kanssa ja 2C=BSA-konjugoitu partikkeli ilman BPQ:a. (©Rati Tandon ja Rentala Madhubala)



## 6. Pohdinta

Viskeraalinen leishmaniaasi on malarian jälkeen eniten infektoiva ja tappava loisperäinen sairaus. Sen leviäminen tapahtuu helposti hietakärpäsen avulla ja infektiota on erittäin raju. Tällä hetkellä käytössä olevat lääkeaineet ovat erittäin toksisia ja aiheuttavat rajuja sivuvaikutuksia. Lisäksi loiskannat muodostavat herkästi resistenssin kaikkia käytössä olevia lääkeaineita vastaan, mikä asettaa haasteita erilaisten hoitomuotojen kehittämiseksi. Mesohuokoisten piinanopartikkelien käyttö erilaisiin lääketieteellisiin tarkoituksiin kehittyy koko ajan. Mesohuokoisen piinan uniikki muokattavuus tekee siitä monimuotoisen käyttökohteen monille sovelluksille. Jopa erittäin huonosti liukenevat lääkeaineet, kuten buparvaquone, pystytään lataamaan partikkeleihin. Tämä ominaisuus helpottaa hankalasti soluihin saatavien lääkeaineiden kuljetusta ja kohdentamista haluttuun kudokseen tai soluihin.

Internalisaatiokokeiden tulokset osoittivat että mesohuokoiset piinanopartikkelit pystyvät menemään solun sisälle makrofageihin. Nanopartikkeliin pinnalle konjugoitu proteiini vaikutti internalisaation ja fluoresenssin vahvuuteen. Avidiini-konjugoiduilla partikkeleilla oli selvästi paras ja johdonmukaisin tulos. Muilla proteiineilla konjugoiduilla partikkeleilla havaittiin voimakasta aggregoitumista (streptavidini) tai ei internalisaatiota ja fluoresenssia ollenkaan (IgG). Lisäksi havaittiin että avidiini-konjugoidut partikkelit, joissa on lisäksi biotinyloitu IgG, internalisoituivat huomattavasti heikommin kuin pelkällä avidiinilla konjugoidut. Tulos oli mielenkiintoinen ja vaatii lisätutkimuksia, sillä normaalisti makrofagit reagoivat vasta-aineisiin melko voimakkaasti.

Eri aikapisteet vaikuttivat partikkeleiden internalisaatioon. Mitä pidempään partikkeleita inkuboitin soluilla, sitä enemmän niitä internalisoitui. Pitkän inkubointiajan (24h) haittapuolena tuli myös partikkeleiden voimakas kerääntyminen solujen pintaan ja levyn pohjalle. Internalisaatio oli erittäin nopeata, sillä jo yhden tunnin inkuboinnilla partikkeleiden havaittiin pääsien makrofagien sisälle. Neljän tunnin inkubointiajalla oli näistä kolmesta aikapisteestä paras vaikutus: yhden tunnin aikana internalisaatiota tapahtui, mutta ei riittävästi ja vastaavasti 24 tunnin inkuboinnilla tapahtui aggregoitumista. Optimaalisin inkubointiaika voisi olla noin 10 tuntia.

Eri partikkelien välillä oli eroja siinä, minkä verran ne aggregoituivat (kerääntyivät) kuoppalevyn pohjalle inkubointien aikana. Suurinta aggregoitumista oli selvästi streptavidiinilla pinnoitetuilla partikkeleilla. Tämä partikkeli oli käytetyistä partikkelieristä vanhin. Aggregoitumista oli selvästi vähiten avidiinipinnoitetuissa partikkeleissa, joissa oli lisäksi biotinyloitu IgG mukana. Tämä erä oli

partikkelieristä tuorein, joten säilytysajalla on selvästi vaikutusta aggregaation syntyyn. Kaikki partikkelit käsiteltiin samalla tavalla koesarjojen aikana. IgG –vasta-aineella pinnoitettujen partikkelien kanssa ei näkynyt lainkaan internalisaatiota. Normaalilla valotiellä katsottaessa kuitenkin näkyy että partikkeleita on kuoppalevyn pohjalla. Tästä voidaan päätellä että joko proteiinin FITC-leimaus on epäonnistunut tai vasta-aine ei ole jäänyt kiinni partikkelien pintaan. Aggregaatiolla on internalisaatioon selvä vaikutus. Voimakas aggregaatio saa partikkelit vajoamaan levyn pohjalle jolloin ne pääsevät lähemmäs soluja, mutta liian suuret partikkeliaggregaatit eivät internalisoidu ollenkaan.

Partikkeleiden ei havaittu olevan toksisia terveille soluille. Partikkelit, joihin oli sidottu lääkeaine olivat toksisempia kuin tyhjät partikkelit, mikä viittaisi lääkeaineen vapautumiseen solussa tai sen ulkopuolella. Suuret konsentraatiot buparvaquonea olivat selvästi toksisia, mutta pienempien konsentraatioiden havaittiin jopa lisäävän solujen viabiliteettia. Tämä voi johtua esimerkiksi buparvaquonen mahdollisesta vaikutuksesta elektroninsiirtoketjuun ja sitä kautta solujen aineenvaihduntaan.

Yhteistyölaboratoriomme Intiassa tutki buparvaquonella ladattujen piinanopartikkeleiden vaikutusta solunsisäisiin amastigootteihin. Havaittiin, että amastigoottien määrä väheni parhaassa tapauksessa yli 70 %. Tästä amastigoottien vähenemisestä huolimatta solut säilyivät hengissä, jolloin lääkeaine on tuhonnut loisen mutta ei vaikuta terveeseen solun toimintaan. Avidiini-konjugoiduilla partikkeleilla saatiin selvästi parhaat tulokset sekä internalisaatiokokeissa että amastigootteihin vaikuttamisesta. Avidiinilla pystytään hyvin lisäämään nanopartikkeleiden internalisaatiota makrofageihin.

Työn tarkoituksena oli optimoida internalisaatio-olosuhteet nanopartikkeleille ja lisäksi tutkia käytetyn lääkeaineen ja partikkeleiden toksisuutta terveille soluille. Havaittiin että internalisaatiota tapahtuu ja inkubointiaikaa saatiin muokattua optimaaliseksi. Partikkeleiden ei havaittu olevan toksisia ja käytetty lääkeaine tehoaa amastigootteihin *in vitro*. Paljon on edelleen pohdittavaa ja selvitettävää tämän yhdistelmän käyttämisessä. Buparvaquonen tarkkaa toimintamekanismia solun sisällä ei vielä tiedetä ja tämän tutkimuksen perusteella ei voida sanoa, vapautuuko lääkeaine solussa vai solun ulkopuolella. Lisäksi kaikki kokeet suoritettiin *in vitro*; *in vivo* vaikutusten tutkiminen olisi seuraava vaihe. Näiden tulosten perusteella voidaan sanoa että buparvaquonella ladatut nanopartikkelit voisivat tulevaisuudessa olla yksi mahdollinen hoitomuoto viskeraaliseen leishmaniaasiin.

## 6. Lähdeluettelo

- Anglin, E. J., Cheng, L., Freeman, W. R., & Sailor, M. J. (2008). Porous silicon in drug delivery devices and materials. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(11), 1266-1277.
- Arruebo, M., Valladares, M., & Gonzalez-Fernandez, \. (2009). Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications. *J.Nanomaterials*, 2009, 37:1-37:24.
- Barkalina, N., Jones, C., & Coward, K. (2014). Mesoporous silica nanoparticles: A potential targeted delivery vector for reproductive biology? *Nanomedicine (London, England)*, 9(5), 557-560.
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., et al. (2007). Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews.Microbiology*, 5(11), 873-882.
- Chawla, B., Jhingran, A., Panigrahi, A., Stuart, K. D., & Madhubala, R. (2011). Paromomycin affects translation and vesicle-mediated trafficking as revealed by proteomics of paromomycin-susceptible -resistant leishmania donovani. *PloS One*, 6(10), e26660. *Development of vaccines against visceral leishmaniasis*(2012).
- Faraji, A. H., & Wipf, P. (2009). Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(8), 2950-2962.
- Franco, L. H., Beverley, S. M., & Zamboni, D. S. (2012). *Innate immune activation and subversion of mammalian functions by leishmania lipophosphoglycan*
- Garnier, T., Mantyla, A., Jarvinen, T., Lawrence, J., Brown, M., & Croft, S. (2007). In vivo studies on the antileishmanial activity of buparvaquone and its prodrugs. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(4), 802-810.
- Guo, J., Song, W., Ding, F., Zhang, J., & Sun, Z. (2012). Study on cytotoxicity and structure-activity relationship of HL-7702 cell exposed to naphthoquinones. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 33(3), 408-413.

- Haldar, A. K., Sen, P., & Roy, S. (2011). *Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: Current status and future directions*
- Hon, N. K., Shaposhnik, Z., Diebold, E. D., Tamanoi, F., & Jalali, B. (2012). Tailoring the biodegradability of porous silicon nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 100(12), 3416-3421.
- Joshi, S., Rawat, K., Yadav, N. K., Kumar, V., Siddiqi, M. I., & Dube, A. (2014). Visceral leishmaniasis: Advancements in vaccine development via classical and molecular approaches. *Frontiers in Immunology*, 5, 380.
- Kaur, G., & Rajput, B. (2014). Comparative analysis of the omics technologies used to study antimonial, amphotericin B, and pentamidine resistance in leishmania. *Journal of Parasitology Research*, 2014, 726328.
- Kumar, R., & Nylän, S. (2012). Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, 3, 10.3389/fimmu.2012.00251.
- Lodge, R., & Descoteaux, A. (2006). Phagocytosis of leishmania donovani amastigotes is Rac1 dependent and occurs in the absence of NADPH oxidase activation. *European Journal of Immunology*, 36(10), 2735-2744.
- Luo, G. F., Chen, W. H., Liu, Y., Lei, Q., Zhuo, R. X., & Zhang, X. Z. (2014). Multifunctional enveloped mesoporous silica nanoparticles for subcellular co-delivery of drug and therapeutic peptide. *Scientific Reports*, 4, 6064.
- Mantyla, A., Rautio, J., Nevalainen, T., Vepsäläinen, J., Juvonen, R., Kendrick, H., et al. (2004). Synthesis and antileishmanial activity of novel buparvaquone oxime derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12(13), 3497-3502.
- Meng, H., Wang, M., Liu, H., Liu, X., Situ, A., Wu, B., et al. (2015). Use of a lipid-coated mesoporous silica nanoparticle platform for synergistic gemcitabine and paclitaxel delivery to human pancreatic cancer in mice. *ACS Nano*, 9(4), 3540-3557.
- Mohseni, M., Gilani, K., & Mortazavi, S. A. (2015). Preparation and characterization of rifampin loaded mesoporous silica nanoparticles as a potential system for pulmonary drug delivery. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, 14(1), 27-34.

- Monzote, L. (2009). Current treatment of leishmaniasis: A review. *Open Antimicrob Agents J*, 1, 9-19.
- Moradin, N., & Descoteaux, A. (2012). Leishmania promastigotes: Building a safe niche within macrophages. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2
- Mudavath, S. L., Talat, M., Rai, M., Srivastava, O. N., & Sundar, S. (2014). Characterization and evaluation of amine-modified graphene amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis: In vivo and in vitro studies. *Drug Design, Development and Therapy*, 8, 1235-1247.
- Musa, A. M., Younis, B., Fadlalla, A., Royce, C., Balasegaram, M., Wasunna, M., et al. (2010). Paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis in sudan: A randomized, open-label, dose-finding study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(10), e855.
- Paila, Y. D., Saha, B., & Chattopadhyay, A. (2010). Amphotericin B inhibits entry of leishmania donovani into primary macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 399(3), 429-433.
- Palit, P., Hazra, A., Maity, A., Vijayan, R. S., Manoharan, P., Banerjee, S., et al. (2012). Discovery of safe and orally effective 4-aminoquinoline analogues as apoptotic inducers with activity against experimental visceral leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(1), 432-445.
- Park, Ji-Ho, Gu, Luo, von Maltzahn, Geoffrey, Ruoslahti, Erkki, Bhatia, S.,N., & Sailor, M.,J. Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for in vivo applications.
- Perez-Victoria, F. J., Sanchez-Canete, M. P., Seifert, K., Croft, S. L., Sundar, S., Castanys, S., et al. (2006). Mechanisms of experimental resistance of leishmania to miltefosine: Implications for clinical use. *Drug Resistance Updates : Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 9(1-2), 26-39.
- Reimao, J. Q., Colombo, F. A., Pereira-Chioccia, V. L., & Tempone, A. G. (2012). Effectiveness of liposomal buparvaquone in an experimental hamster model of leishmania (L.) infantum chagasi. *Experimental Parasitology*, 130(3), 195-199.

- Singh, O. P., & Sundar, S. (2014). Immunotherapy and targeted therapies in treatment of visceral leishmaniasis: Current status and future prospects. *Frontiers in Immunology*, 5, 10.3389/fimmu.2014.00296.
- Slowing, I. ?, Trewyn, B. ?, Giri, S., & Lin, V. ? .-. (2007). Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery and biosensing applications. *Advanced Functional Materials*, 17(8), 1225-1236.
- Stanley, A. C., & Engwerda, C. R. (2007). Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunology and Cell Biology*, 85(2), 138-147.
- Sundar, S., & Olliaro, P. L. (2007). Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 3(5), 733-740.
- Wang, X., Teng, Z., Wang, H., Wang, C., Liu, Y., Tang, Y., et al. (2014). Increasing the cytotoxicity of doxorubicin in breast cancer MCF-7 cells with multidrug resistance using a mesoporous silica nanoparticle drug delivery system. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(4), 1337-1347.
- Wiwanitkit, V. (2012). Interest in paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar). *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 8, 323-328.
- Xu, W., Riikonen, J., & Lehto, V. P. (2013). Mesoporous systems for poorly soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 453(1), 181-197.
- Zhao, L., Seth, A., Wibowo, N., Zhao, C. X., Mitter, N., Yu, C., et al. (2014). Nanoparticle vaccines. *Vaccine*, 32(3), 327-337.